

**Leukämische Fusionsproteine mit Tyrosinkinase-Aktivität  
induzieren eine konstitutive Aktivierung von STAT1, STAT3 und  
STAT5 und verursachen eine maligne Transformation von  
hämatopoetischen Vorläuferzellen**

Michael J. Pau  
München  
2004

Aus der Abteilung Hämatologie und Onkologie der Medizinischen Klinik  
und Poliklinik III, der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Wolfgang Hiddemann

**Leukämische Fusionsproteine mit Tyrosinkinase-Aktivität  
induzieren eine konstitutive Aktivierung von STAT1, STAT3 und  
STAT5 und verursachen eine maligne Transformation von  
hämatopoetischen Vorläuferzellen**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Michael J. Pau  
aus  
München  
2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

---

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. W. Hiddemann
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. G. Längst Prof. Dr. B. Emmerich
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. K. Spiekermann
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	07.10.2004

Meinem verstorbenem  
Vater gewidmet

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>3</b>
1.1. Grundlegende Fragestellung.....	3
1.2. Akute Myeloische Leukämie .....	4
1.3. Der STAT-Signalweg .....	7
1.3.1. Einführung in die Funktion.....	7
1.3.2. Molekularer Aufbau der STAT-Proteine .....	8
1.3.3. Die Familie der STAT-Proteine .....	10
1.4. Leukämische Fusionsproteine mit Tyrosin-Kinase-Aktivität .....	11
1.4.1. TEL-JAK2.....	12
1.4.2. BCR-ABL und TEL-ABL .....	13
1.5. FLT3 und FLT3ITD in der Hämatopoese und Leukämie .....	15
1.6. Zielsetzung der Arbeit .....	17
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
2.1. Zellkulturmethoden .....	18
2.1.1. Materialien für die Zellkultur .....	18
2.1.2. Kultivierung verschiedener Zelllinien .....	18
2.1.3. Bestimmung der Zelldichte.....	19
2.1.4. Einfrieren und Auftauen von Zellvorräten .....	19
2.1.5. Herstellung von WEHI-Überständen .....	20
2.1.6. Zelllinien .....	20
2.1.7. Transfektion von Zellen .....	21
2.1.8. Proliferationsassays .....	22
2.1.9. Selektive PTK-Inhibitoren .....	23
2.2. Biochemische Methoden.....	23
2.2.1. Lösungen und Puffer .....	23
2.2.2. Lyse von Zellen .....	25
2.2.3. Proteinbestimmung nach Bradford .....	25
2.2.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	26

---

2.3.	Immunologische Methoden .....	27
2.3.1.	Lösungen und Puffer .....	27
2.3.2.	Immunopräzipitation .....	28
2.3.3.	Immunoblot .....	29
2.3.4.	Stripping von Immunoblot .....	30
2.4.	Antikörper .....	31
2.5.	Plasmid-DNA .....	31
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
3.1.	Tyrosin-Phosphorylierung von STAT 1, 3 und 5 durch leukämische PTK in 293HEK-Zellen .....	33
3.2.	Induktion von IL-3-unabhängigem Wachstum von Ba/F3-Zellen durch leukämische PTK .....	36
3.3.	Tyrosin-Phosphorylierung von STAT 1, 3 und 5 durch leukämische PTK in Ba/F3-Zellen .....	39
3.4.	Konstitutiv aktives STAT 3 und STAT 5 induziert IL-3-unabhängiges Wachstum von Ba/F3-Zellen .....	41
3.5.	Einfluss des Inhibitors STI571 auf die Phosphorylierung der Fusionsproteine und von STAT5 in Ba/F3-Zellen .....	42
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>46</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>57</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>58</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>67</b>
7.1.	Abkürzungsverzeichnis .....	67
7.2.	Aus dieser Arbeit hervorgegangene Veröffentlichung .....	68
7.3.	Danksagung .....	68
7.4.	Lebenslauf .....	69

## 1. Einleitung

Die Begriffe „Neoplasie“ (Neubildung) und „Tumor“ werden im Allgemeinen synonym verwendet. Man versteht darunter die abnorme Vergrößerung eines Gewebes, welche durch autonome, progressive und überschießende Proliferation körpereigener Zellen entsteht. Der Begriff „Krebs“ steht für maligne Tumoren, die sich von benignen Tumoren durch infiltratives und destruktives Wachstum sowie die Fähigkeit zur Metastasenbildung unterscheiden. Ebenso werden solide Tumoren, die als Zellverband von epithelialen (Karzinome) oder mesodermalen Ursprungs (Sarkome) sind, von nicht-soliden differenziert, die aus Neoplasien des hämatopoetischen Systems hervorgehen.

Bei der Betrachtung der Funktionsebenen einer Zelle von extern nach intern, lassen sich die Möglichkeiten der malignen Transformation gut veranschaulichen: Auf der Membranebene können sowohl hämatopoetische Wachstumsfaktoren als auch der intrinsisch aktive Rezeptorkomplex, auf der Ebene des Zytosols die als Signalvermittler fungierenden Kinasen, und auf Nukleusebene z.B. Transkriptionsmechanismen Mutationen aufweisen, die die Homöostase einer Zelle in die Richtung der anti-apoptotischen und pro-proliferativen Eigenschaften verschieben. Unzweifelhaft sind zumeist mehrere Ebenen gleichzeitig beeinflusst und zudem bidirektional, d.h. es tragen auch eine verminderte Aktivität der anti-proliferativen und pro-apoptotischen Signalwege zur Transformierung der Zelle bei. Es bestehen jedoch auf dem Wege gemeinsame Kaskaden, so wie es von den STAT(=Signal Transducers and Activators of Transcription)-Molekülen bekannt ist.

### 1.1. Grundlegende Fragestellung

Deshalb geht diese Arbeit der zentralen Frage nach, ob und wie leukämische Fusionsproteine mit konstitutiver Tyrosinkinaseaktivität, also mit Transformationspotential, auf die konstitutive Aktivierung von STAT1, 3 und 5 wirken, und ob deren konstitutive Aktivierung, im Besonderen von STAT3 und STAT5, alleine ausreichend ist, um hämatopoetische Vorläuferzellen, hier eine Pro-B-Zelllinie, zu transformieren, da durch mehrere Veröffentlichungen hinlänglich bekannt ist, dass in der AML die STAT-Aktivierung eine fundamentale Rolle einzunehmen scheint.

## 1.2. Akute Myeloische Leukämie

Blutzellen können, ebenso wie andere Zelltypen, zu bösartigen (malignen) Zellen entarten. Die Krebsform, die dann entsteht, ist durch eine deutlich gesteigerte Zahl bestimmter Blutzellen gekennzeichnet, die sich alle im selben Entwicklungsstadium befinden. Der Begriff Leukämie wurde 1856 von dem deutschen Pathologen Rudolf Virchow eingeführt. Das Wort ist aus dem Griechischen entlehnt und bedeutet „weißes Blut“. Bei seinen Untersuchungen am Blut eines Patienten hatte Virchow einen weißen Niederschlag beobachtet, der durch eine Verschiebung der Zellanteile zugunsten der „weißen“ Blutzellen (=Leukozyten) gegenüber den „roten“ Blutzellen (=Erythrozyten) gekennzeichnet ist. Man unterscheidet bei den Leukämien je nach klinischem Verlauf, Reifegrad und Abstammung der pathologisch veränderten Leukozyten in akute und chronische, unreifzellige und reifzellige und lymphatische und myeloische Leukämie.

Der heutige Erkenntnisstand bezüglich der AML ist differenzierter: Sie ist eine akute, maligne hämatologische Erkrankung, die durch Vermehrung eines Zellklons unreifer (leukämischer) Blasten im Knochenmark mit Verdrängung der normalen Hämatopoese und konsekutiver Knochenmarksinsuffizienz gekennzeichnet ist. Sie kann in allen Altersstufen vorkommen, stellt aber die typische akute Leukämie des Erwachsenen dar, deren Inzidenz mit steigendem Alter zunimmt. Neuere Statistiken aus der USA und aus Großbritannien, die sich mit den Zahlen aus der BRD decken, ergaben für die AML eine Inzidenz von 2,5 - 2,96 pro 100000 Einwohner.

Ätiologisch werden verschiedene Ursachen diskutiert: Umweltfaktoren wie Benzol (CRONKITE 1987) und radioaktive Strahlenbelastung (KATO u. SCHULL 1982), aber auch alkylierende Chemotherapeutika (CURTIS et al. 1990) gelten als leukämogen. Bei Kindern wird diskutiert, ob das Fehlen von Schutzimpfungen und Infektionen zur Risikosteigerung beiträgt. Auch der Einfluss von viralen Infektionen auf die Entwicklung der AML ist Gegenstand intensiver Forschung. Der Einfluss genetischer Faktoren auf die Entstehung einer AML geht nicht zuletzt aus der Tatsache hervor, dass Patienten mit Down-Syndrom (Trisomie 21) zwanzigmal häufiger an AML erkranken als Personen der Normalbevölkerung (KOJIMA et al. 1990). Krankheiten wie die Polycythaemia vera und das Myelodysplastische Syndrom (MDS) prädisponieren ebenfalls für die Entwicklung einer AML (RAAIJMAKERS et al. 1991). Alle bisher erwähnten Ursachen



begründen allerdings lediglich 10% der AML-Erkrankungen, während es für 90% der Krankheitsfälle derzeit keine Erklärung gibt.

Die Genetik der Zellen hat der Wissenschaft sehr viele Einblicke in die Biologie und auch die Therapie der AML vermittelt. Kaum eine Erkrankung ist heute bezüglich ihrer Genetik so weitgehend aufgeschlüsselt und definiert wie die AML. Typisch sind bestimmte Veränderungen an den Genen, die z.B. zu deren Verbindung (Fusion) führen, wie es noch in folgenden Kapiteln eingehender geschildert wird. Um die Auswirkungen genetischer Veränderungen besser verstehen zu können, muss man sich die Vorgänge bei der Blutbildung im Knochenmark vergegenwärtigen. Stammzellen entwickeln sich über Zellteilungen und Differenzierungen z.B. zu blutbildenden Stammzellen, die nach einer gewissen Zeit wiederum absterben. Die Differenzierung wird gesteuert von Zytokinen, von Wachstumsfaktoren. Diese wiederum werden von bestimmten Genen kodiert. Bei der AML entstehen nun durch bestimmte Veränderungen Genmutationen, die infolge einen Stopp in der Zelldifferenzierung auslösen können. Das bedeutet, dass die Differenzierung an einem bestimmten Punkt blockiert wird. Die Zellen können sich also nicht mehr hin zur Funktionsreife und zum späteren Absterben, der Apoptose, entwickeln mit der Folge eines oben schon erwähnten unreifen Zellklons, der ständig proliferiert und Zellen der normalen Hämatopoese verdrängt.

Das klinische Bild der AML ist meistens von den Folgen der Knochenmarksinsuffizienz mit Neutropenie, Anämie und Thrombozytopenie, in selteneren Fällen auch durch Organinfiltration (z.B. Meningen, Chlorome) geprägt. Bei ca. 80% der Patienten kann durch eine Induktionstherapie mit Cytosinarabinsid und einem Anthrazyklin eine komplette Remission erreicht werden, doch trotz nachfolgender zytostatischer Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate aller Patienten nur 30-40% (LATHAN et al. 1994).

Zur Einteilung der verschiedenen Subtypen der AML wurden 1976 von der French-American-British (FAB) cooperative-group Vorschläge gemacht, diese in Gruppen M1-M6 einzuteilen (Tab.1). Dieser Klassifikation lagen morphologische und zytochemische Kriterien zugrunde (BENNETT et al 1976). Sie wurde später um die Gruppen M0 und M7 erweitert.

Mittlerweile wurde entdeckt, dass zahlreiche Fälle von AML mit wiederkehrenden genetischen Abnormalitäten assoziiert sind, die zelluläre Signalwege der myeloischen

Reifung und Proliferation affektieren. Die FAB-Klassifikation lieferte jedoch nur einen morphologisch-zytochemischen Rahmen, in dem die Bedeutung der genetischen Läsionen nur abgeschätzt werden konnte. Allerdings sind morphologisch-genetische Korrelationen nicht immer sicher. Genetische Befunde vermögen die Progose und biologische Eigenschaften der Leukämie konsistenter vorherzusagen als die morphologischen und die klinische-genetische Diversität der Erkrankung besser widerzuspiegeln, deshalb hat die World-Health-Organisation (WHO) mit der „Society for Hematopathology“ und der „European Association of Hematopathology“ eine neue Klassifikation für die AML erstellt (Tab.2).

Prognostisch günstige genetische Veränderungen kommen bei etwa 20% der Patienten vor. Dazu zählen die Translokation t(8;21), die sich gehäuft in Blasten von Patienten mit AML M2 findet, die Translokation t(15;17), die in ca. 90% der Fälle von AML M3 vorkommt und für einen veränderten Retinoinsäurerezeptor kodiert, sowie die Inversion inv.16, die am häufigsten bei Patienten mit AML M4, insbesondere M4eo, oder M5 beobachtet wird. Prognostisch ungünstig hingegen ist unter anderem das Auftreten von Deletionen wie 5q-, 7q-, 11q-, von Monosomien der Chromosomen 5 und 7. Solche Veränderungen finden sich bei weiteren 20% der Patienten. Die verbleibenden 60% mit einem meist normalen Karyotyp nehmen eine prognostische Mittelstellung ein.

**Tabelle 1:**

**FAB-Klassifikation**

FAB M0	akute undifferenzierte myeloische Leukämie
FAB M1	akute myeloische Leukämie ohne Ausreifung
FAB M2	akute myeloische Leukämie mit Ausreifung
FAB M3	akute Promyelozytenleukämie
FAB M3 var.	akute Promyelozytenleukämie, hypogranuläre Variante
FAB M4	akute myelomonozytäre Leukämie
FAB M4Eo	akute myelomonozytäre Leukämie mit Eosinophilie
FAB M5	akute Monozytenleukämie
FAB M5a	akute Monoblastenleukämie
FAB M5b	akute promonozytäre-monozytäre Leukämie
FAB M6	akute Erythroblastenleukämie
FAB M7	akute Megakaryoblastenleukämie

**Tabelle 2:**

WHO-Klassifikation

<p><b><u>Akute myeloische Leukämie mit wiederkehrenden genetischen Aberrationen</u></b></p> <p>→ Akute myeloische Leukämie mit t(8;21)(q22;q22), (AML1/ETO)</p> <p>→ Akute myeloische Leukämie mit Eosinophilie des Knochenmarks und inv(16)(p13q22) oder t(16;16)(p13;q22), (CBFβ/MYH11)</p> <p>→ Akute Promyelozyten-Leukämie mit t(15;17)(q22;12), (PML/RARα) und Varianten dessen</p> <p>→ Akute myeloische Leukämie mit 11q23 (MLL) Aberration</p> <p><b><u>Akute myeloische Leukämie mit Dysplasien mehrerer Entitäten</u></b></p> <p>→ mit nachfolgender MDS oder MDS/MPD</p> <p>→ ohne vorausgehendem MDS oder MDS/MPD, jedoch mit Dysplasien in mindestens 50% der Zellen in mindestens zwei Zelldifferenzierungen</p> <p><b><u>Akute myeloische Leukämie-Syndrome - therapiebezogen</u></b></p> <p>→ durch alkylierende Substanzen oder durch Bestrahlung hervorgerufen</p> <p>→ durch eine Topoisomerase II Inhibitor-Behandlung hervorgerufen</p> <p>→ Andere</p> <p><b><u>Akute myeloische Leukämie anderweitig nicht klassifiziert</u></b></p> <p>→ Akute myeloische Leukämie mit minimaler Zelldifferenzierung</p> <p>→ Akute myeloische Leukämie ohne Zelldifferenzierung</p> <p>→ Akute myeloische Leukämie mit Zelldifferenzierung</p> <p>→ Akute myelomonozytische Leukämie</p> <p>→ Akute monoblastische/ Akute monozytische Leukämie</p> <p>→ Akute erythroide Leukämie (erythroide/myeloische/rein erythroleuk.)</p> <p>→ Akute megakaryoblastische Leukämie</p> <p>→ Akute basophile Leukämie</p> <p>→ Akute Panmyelose mit Myelofibrose</p> <p>→ Myeloisches Sarkom</p>
---

## 1.3. Der STAT-Signalweg

### 1.3.1. Einführung in die Funktion

Vor mittlerweile mehr als zehn Jahren wurden im Zusammenhang mit den Arbeiten über die Genaktivierungen diverser Interferone (IFN) die STAT-Proteine, insbesondere STAT1 und STAT2, entdeckt (BROMBERG et al. 2001). Inzwischen hat man in Säugetieren sieben verschiedene STAT-Moleküle und in Nicht-Säugetieren eine noch größere Vielzahl isolieren können, und es wurde klar, dass sie eine wichtige Rolle bezüglich des Zellwachstums und der Zellentwicklung spielen. STAT-Proteine sind eine Familie von latenten Transkriptionsfaktoren, die reichlich in vielen Zelltypen exprimiert werden. Sie werden durch Phosphorylierung an einem einzigen Tyrosin oder/und Serin,

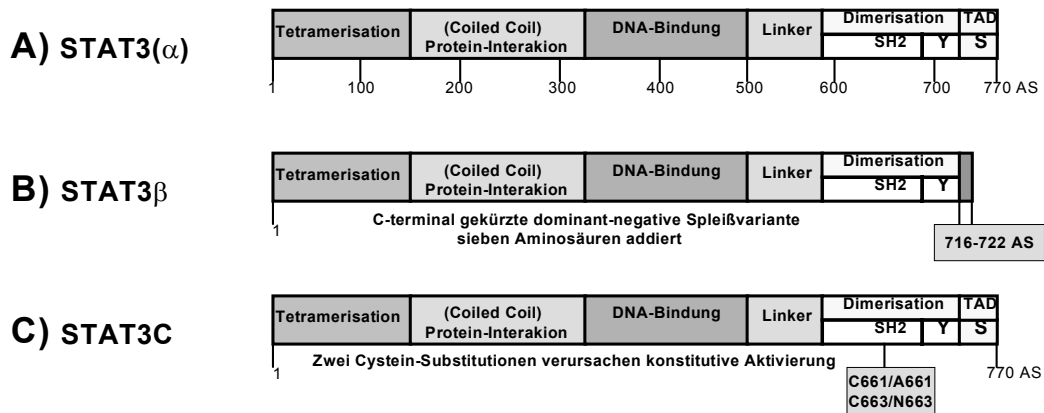
das sich am Carboxyl-Terminus des Moleküls befindet, typischerweise als Antwort auf extrazelluläre Ligandenbindung aktiviert. Ein aktives STAT-Dimer wird durch reziproke Interaktionen zwischen der SH2-Domäne eines Monomers und dem phosphorylierten Tyrosins eines anderen STAT-Proteins gebildet (BROMBERG et al. 2001). Die aktiven Dimere akkumulieren im Nukleus, erkennen spezifische DNA-Elemente in den Promoterregionen der Gene wieder und aktivieren deren Transkription.

Die Kontrolle des Wachstums und der Homöostase von normalen Zellen in einem sich entwickelnden oder adulten Säugetier sind sorgfältigst ausgewogen. Viele der Signale, die diese Balance beeinflussen, werden von zirkulierenden Polypeptiden übermittelt, deren Bindung an Rezeptoren der Zelloberfläche die Gen-spezifische Transkription bestimmt. Über 40 verschiedene Polypeptide können die STAT-Aktivierung vermitteln, entweder durch Zytokine und/oder G-Protein-Rezeptoren im Zusammenspiel mit JANUS-Kinasen oder durch Wachstumsfaktoren mittels intrinsischer Rezeptor-Tyrosinkinasen (BROMBERG et al. 2001). Darüber hinaus führen Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie z.B. src und abl, zur STAT-Aktivierung. Es wurde gezeigt, dass Tumorzellen des Menschen oft genau diese Kontrolle der normalen Signalsysteme verloren haben, und im Zusammenhang mit persistierender mitogener Signalgebung das Fehlen von ausreichender Unterdrückung des Signals durch Tumorsuppressoren entscheidend bei der Entstehung von Neoplasien ist. Im folgenden soll noch auf die molekulare Struktur und das biologische Verhalten als Transkriptionsfaktoren der STATs eingegangen werden.

### **1.3.2. Molekularer Aufbau der STAT-Proteine**

Abgesehen von funktionellen Unterschieden der individuellen STAT-Proteine haben durch kristallographische Studien der DNA-Bindungsdomäne von STAT1 und STAT3 sowie der N-terminalen Domäne von STAT4, genauso wie durch Sequenzvergleich und mutagenen Deletionsversuchen, Gemeinsamkeiten in den Strukturen der STAT-Moleküle aufgeklärt werden können (CHEN et al 1998 und BECKER et al. 1998). Die Basis der Struktur aller STAT-Proteine ist anhand des Beispiels von STAT3 als Prototyp in Abbildung 1 illustriert.

**Abbildung 1: molekulare Struktur der STAT-Moleküle (Buettner et al. 2002)**



Die NH<sub>2</sub>-terminale Region der STATs schafft eine Protein-Protein-Interaktionsseite, die benötigt wird, damit Dimere untereinander interagieren können, so dass sich auch tetramere STAT-Moleküle herausbilden. Diese Tetramerisation bewirkt eine Stabilisierung der DNA-Bindungsaktivität an schwachen Promotoren (VINKEMEIER et al. 1996 und JOHN et al. 1999). Die benachbarte coiled-coil-Domäne ist auch eine Protein-Protein-Interaktionsseite, die eine potentielle Kontaktstelle für Transkriptionsfaktoren und andere regulatorische Proteine bildet (BROMBERG/DARNELL 2000). Die DNA-Bindungsdomäne im Zentrum des Moleküls legt die Spezifität der DNA-Sequenz der individuellen STAT-Moleküle fest (CHEN et al 1998 und BECKER et al. 1998). Eine Linker-Region, die an der DNA-Bindung teilnimmt, grenzt an die C-terminale SH2-Domäne, die für die Rekrutierung der STATs zur Rezeptorphosphorylierung benötigt wird und für reziproke SH2-Phosphotyrosin-Interaktionen zwischen monomeren STATs, um Dimere zu bilden (SHUAL et al 1994). Der entscheidende Tyrosinrest, der für die SH2-Phosphotyrosin-Interaktion und damit für die STAT-Aktivierung erforderlich ist, liegt nahe der SH2-Domäne.

Die TAD-Box am C-terminalen Ende des Moleküls ist an der Kommunikation mit Transkriptionskomplexen beteiligt und, wie im Fall von STAT1 und 3, beinhaltet einen Serin-Phosphorylierungsrest, der die Transkriptionsaktivität steigern kann (WEN et al. 1995). Obwohl die primäre Aminosäuresequenz dieser TAD-Domäne zwischen den einzelnen STATs variiert, ist sie, wie aus Protein-Deletionsversuchen bekannt, für deren Funktion essentiell. Deletionen in diesem Bereich der STATs verhindern nicht die Bindung des Moleküls an die DNA, weisen aber in der Regel eine hochspezifisch dominant-negative Aktivität auf (CALDENHOVEN et al. 1996, SASSE et al 1997).

Solche trunkierten Formen, z.B. STAT3 $\beta$ , wurden als natürlich vorkommende Spleißvarianten identifiziert, nur ist deren physiologische Funktion noch ungeklärt. Dominant positive, im Sinne von konstitutiv aktiven STATs, wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um die Rolle der STATs in der malignen Transformation der Zellen näher zu erklären.

### 1.3.3. Die Familie der STAT-Proteine

Zur Zeit sind sieben STAT-Proteine bekannt, STAT1 bis STAT4, STAT5A, STAT5B und STAT6. Ihr Molekulargewicht variiert von 80-113kDa. STAT1 und STAT3 kommen jeweils in den Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$  vor. In beiden Fällen handelt es sich um Spleißvarianten desselben Genortes, wobei die  $\beta$ -Isoform am Carboxylende trunkiert ist. Dadurch verändern sich auch die Aktivitäten bezüglich der Transkription: während die  $\alpha$ -Isoformen von STAT1 und STAT3 transkriptionsfördernd wirken, binden die  $\beta$ -Isoformen zwar an die DNA, haben aber keine eigene transkriptionelle Aktivität (siehe 1.3.2.). Vielmehr besetzen sie potentielle Bindungsstellen der  $\alpha$ -Isoformen und stellen damit kompetitive Inhibitoren der  $\alpha$ -Isoformen dar. Auch von anderen STATs sind Spleißvarianten bekannt, erscheinen allerdings weniger bedeutungsvoll. Bei den STAT5-Isoformen STAT5A und STAT5B handelt es sich nicht um Spleißvarianten, sondern um Produkte verschiedener Genorte. Abgesehen von STAT4, das bisher nur in hämatopoetischen Zellen und in Hodengewebe nachgewiesen wurde, sind STATs in vielen Geweben zu finden. Eine Auswahl von Faktoren, die ihre Wirkung über die STATs entfalten, ist in Tabelle 3 zusammengefasst.

**Tabelle 3:** STAT-phosphorylierende Faktoren (Shizuo Akira 1999)

Zielprotein	Zytokine und Wachstumsfaktoren
STAT1	IFN- $\alpha$ , $\beta$ , IFN- $\gamma$ , EGF, PDGF, FGF
STAT2	IFN- $\alpha$
STAT3	IL-6, LIF, CNTF, OM CT-1, G-CSF, IL-10, Leptin, EGF, PDGF, Insulin
STAT4	IL-12
STAT5	IL-2, IL-3, Epo, GH, Prolactin, GM-CSF, IL-5, EGF,
STAT6	IL-4, IL-13

Wie bei vielen anderen Proteinen ließ sich die physiologische Rolle der einzelnen Subfamilien der STATs, insbesondere aus Versuchen mit Knockout-Mäusen, die auf den entsprechenden Genen Null-Allele aufwiesen, besonders gut ableiten (SHIZUO AKIRA 1999). Dabei offenbarten Zellen der Hämatopoese ausnehmend häufig einen Defekt (Tab.4):

**Tabelle 4:** Phänotypische Effekte in STAT-Knockout-Mäusen (Shizuo Akira 1999)

Zielprotein <sup>(/-)</sup>	Phänotyp
STAT1	IFN $\alpha/\gamma$ -Signaldefekt, defekte Reaktion auf virale Infektionen; Tumorentstehung $\uparrow$
STAT2	embryonaler Fruchttod
STAT3	embryonaler Fruchttod
STAT4	IL-12-Signaldefekt, keine Differenzierung von Th1-Zellen, defekte NK-Zellen
STAT5A	fehlende Brustdrüsenentwicklung
STAT5B	fehlende Vermittlung der GH abhängigen geschlechtsspez. Effekte auf die Leber
STAT6	IL-4-Signaldefekt, keine Differenzierung von Th2-Zellen, Fehlen von IgE

Wesentliche Anhaltspunkte für die Rolle der STATs im Prozess der malignen Transformation, insbesondere bei hämatologischen Erkrankungen, ergaben sich aus Untersuchungen, in denen eine konstitutive Aktivierung von Mitgliedern der STAT-Familie gezeigt werden konnte. Als Erste zeigten Gouilleux-Gruart et al. (1996), dass STAT1 und STAT5 in der ALL und STAT1, 3 und 5 in der AML konstitutiv aktiviert sind. Auch in Non-Hodgkin-Lymphomen wie der Mycosis fungoides wurde eine Aktivierung von STAT3 gefunden (NIELSEN et al. 1997). Die konstitutive Aktivierung der STATs konnte mit verschiedenen Onkogenen in Zusammenhang gebracht werden, wie z.B. mit v-mpl und v-src (BROMBERG et al. 1998), deshalb wurden die in den folgenden Kapiteln der Einleitung beschriebenen onkogenen Fusionsproteine als Versuchsgrundlage benutzt.

#### 1.4. Leukämische Fusionsproteine mit Tyrosin-Kinase-Aktivität

Genetisch betrachtet können akute Leukämien als klonale Veränderungen charakterisiert werden, die durch somatische Mutationen von hämatopoetischen

Vorläuferzellen entstehen. Sie weisen in der Regel einen selektiven Wachstumsvorteil gegenüber normalen Knochenmarkszellen auf. Eine effektive Strategie, um die Mutationen, die in der Entwicklung der Leukämie beteiligt sind, herauszufinden, ist, häufig vorkommende chromosomale Translokationen und deren Bruchstücke zu klonieren. Durch diese Strategie konnten eine Reihe von Translokationen charakterisiert werden und die biologischen Konsequenzen deren Expression untersucht werden (HANNEMANN et al. 1998).

#### 1.4.1. TEL-JAK2

In den Arbeiten von Lacronique et al. (1997) und Peeters et al. (1997) wurde erstmals eine balancierte Translokation der Gene TEL und JAK2 nachgewiesen. Dabei scheint das Fusionsgen in den mehrheitlichen Fällen eine akute lymphatische B- oder T-Zell-Leukämie und nur in selteneren Fällen eine atypische myeloische Leukämie zu verursachen. Das Fusionsgen resultiert aus der Translokation des JAK2-Gens auf dem Chromosom 9p24 und dem TEL-Gen auf Chromosom 12p13 und definiert sich somit durch: TEL-JAK2 t(9;12)(p24;p13).

Von entscheidender Bedeutung ist hierbei, dass die spezifische Oligomerisierungsdomäne von TEL, das zu der ETS-Familie der Transkriptionsfaktoren gehört, mit der katalytischen Domäne von JAK2, das zu der Familie der Janus-Kinasen gehört, fusioniert und ein Molekül entsteht, das konstitutive Kinaseaktivität zeigt.

Zum besseren Verständnis des Fusionsmoleküls muss noch auf die Rolle der JAK-Proteine eingegangen werden. Die Fähigkeit der JAKs, in der Signaltransduktionskette sowohl vor- als auch nachgeschaltete Proteine, v.a. die STATs (1.2.), zu aktivieren, brachte ihnen den Namen „Janus“-Kinasen ein, der auf die Doppelgesichtigkeit des Gottes Janus zurückgeht. Zur Zeit sind vier JAKs bekannt, JAK1–3 und Tyk2, die nahezu in allen Geweben exprimiert werden. JAKs sind zytoplasmatische Tyrosinkinasen, die entscheidend an der Signalweiterleitung von einer Vielzahl von Mitgliedern der Zytokin-Rezeptor-Superfamilie beteiligt sind, die keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität besitzen (IHLE et al. 1996). Die JAKs, und v.a. das JAK2, vermitteln somit Signalereignisse, die das Überleben der Zelle, deren Proliferation und Differenzierung kontrollieren, durch die transiente Aktivierung des RAS-, PI-3- und STAT-Signalweges (LACRONIQUE et al. 1997). Untersuchungen mit Knock-out-



Mäusen bestätigten diese Bedeutung: Gezieltes Ausschalten von JAK2 führt bereits zum embryonalen Tod der Mäuse, denen myeloische und erythropoetische Zellen vollkommen fehlen, die jedoch eine intakte lymphoide Entwicklung (PARGANAS et al. 1998) aufweisen.

Auf die nicht unerhebliche Rolle von TEL in Bezug auf die Wirkung einer Zelle mit dessen Translokation zu einem Fusionsgen soll im folgenden Kapitel, beim Vergleich der ABL-tragenden Fusionsproteine, eingegangen werden.

#### 1.4.2. BCR-ABL und TEL-ABL

Das Philadelphia-Chromosom, sprich die BCR-ABL-Translokation t(9;22)(q34;q11), die Teile des c-ABL-Gens, das auf Chromosom 9 lokalisiert ist, mit Teilen des BCR-Gens (breakpoint cluster reigion) des Chromosoms 22 fusioniert, bildet das Kennzeichen der chronisch myeloischen Leukämie (CML) (WARMUTH et al. 1999). Abhängig von der Bruchstelle im BCR-Gen resultieren verschiedene chimäre Proteine, meistens die p210 und p190 BCR-ABL Fusionsproteine (VOSS et al. 2000), wovon das p210BCR-ABL mit der CML und das kleinere p190BCR-ABL normalerweise mit der ALL assoziiert ist (OKUDA et al. 1996). Das in dieser Arbeit verwendete Fusionsgen ist die p210-Form, dessen Proteinprodukt eines der meist studierten Signalproteine in der Tumorforschung darstellt.

Von der TEL-ABL Translokation t(9;12) sind auch zwei Formen bekannt, die intensiver erforscht wurden: Beide Varianten gehen aus alternativen Spleißvorgängen des TEL-Gens (siehe 1.3.2) hervor, Typ A mit den TEL-Exons 1-4, die mit dem Exon 2 des ABL-Gens fusionieren, und Typ B mit den TEL-Exons 1-5 und dem gleichen ABL-Partner. Das Exon 5 des Typs B kodiert für eine Grb2-Adapterprotein-Bindungsdomäne. TEL-ABL Typ B ist 185kD groß und wurde in einem Fall von AML (GOLUB et al. 1996) und in einem Fall von CML (ANDREASSON et al. 1997) identifiziert. Das in dieser Arbeit verwendete Fusionsgen, das TEL-ABL Typ A, ist 155kD groß und wurde mit Fällen der ALL in Verbindung gebracht (PAPADOPOULOS et al. 1995). Die für weitere Versuche entscheidende Eigenschaft der Tyrosin-Kinase-Aktivität ist für Typ A und Typ B annähernd die gleiche (HANNEMANN et al. 1998).

Die Familie der humanen ABL-Tyrosinkinasen besteht aus den normalen Zellproteinen c-ABL und ARG (=ABL Related Gene) und verschiedenen pathologischen Formen

davon. Unter allen bekannten Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen sind diese mit am komplexesten (VOSS et al. 2000). Deren Tyrosinkinase-Aktivität und Lokalisation im Zytoplasma und Nukleus werden stringent von den mit ihnen wechselwirkenden Molekülen und von einer Vielzahl von extrazellulären Stimuli reguliert (WARMUTH et al. 1999). Die N-terminale Domäne von c-ABL ist der von Mitgliedern aus der Familie der SRC-Kinasen sehr ähnlich, in der die SRC-homologen Domänen (SH2 und SH3) die katalytische Domäne stellen. Eine 90kD große C-terminale Domäne besteht aus einer Aktin- und DNA-Bindungsdomäne und aus Bindungsstellen für Adapterproteinen wie Crk/CRKL und Grb2. In den ABL-Genen ist die SH2- und SH3-Domäne zu etwa 90-95% konserviert, wohingegen der C-Terminus nur zu ca. 30% Identitäten aufweist.

Der exakte funktionelle Beitrag von BCR zu der transformierenden Fähigkeit von BCR-ABL ist noch unklar. Die N-terminale Region von Aminosäure 1-64 ist wichtig für die konstitutive Aktivierung der c-ABL Kinaseaktivität und möglicherweise auch für die Dimerisierung und Oligomerisierung des BCR-ABL-Proteins. BCR hat auch mehrere funktionell intrinsische Domänen, die auch zur Onkogenese mit ihrer Serin/Threonin-Kinase-Aktivität beitragen könnten, einer Region, die an die SH2-Domäne von ABL binden kann. In normalen Zellen ist das BCR-Produkt stark exprimiert und BCR-Knockout-Mäuse haben eine defekte Funktion der stabkernigen Granulozyten (OKUDA et al. 1996).

Ähnlich verhält es sich um das Wissen von TEL in der Onkogenese. Das TEL (translocation-ets-leukemia)-Protein gehört zur Familie der ETS-Transkriptionsfaktoren, denen alle eine aus 85-Aminosäuren bestehende ETS-Domäne gemeinsam ist, mit der sie als Monomere an die DNA binden können und dadurch einen Einfluss auf die Transkription vieler Gene haben. Die transaktivierenden und regulierenden Domänen unterscheiden sich zum Teil jedoch sehr. Dadurch können Ets-Proteine unterschiedlich auf die Transkription wirken, entweder positiv oder negativ regulierend. Dieses ubiquitär vorkommende Protein besitzt an seinem N-Terminus eine HLH-Domäne (helix-loop-helix), die entscheidenden Einfluss auf die Dimerisierung und folglich Aktivierung der ABL-Kinaseaktivität hat (HANNEMANN et al. 1998).

Aus den schon zitierten Arbeiten ist zur Differenzierung der biologischen Eigenschaften zwischen BCR-ABL, TEL-ABL und c-ABL Folgendes demonstriert worden:

- Unterschiedliche Substratpräferenzen zwischen normalen und onkogenen Formen der ABL-Kinasen und auch innerhalb der onkogenen Formen;

- Deutliche Hinweise darauf, dass die onkogenen Formen eine breitere Vielfalt von Zielproteinen phosphorylieren, als die wildtyp-Form von ABL und weiterhin besitzen BCR-ABL und TEL-ABL signifikante Ähnlichkeiten in ihrer Signaltransduktion;
- Im Vergleich zu c-ABL werden die für die Proliferation und das Zellüberleben entscheidenden Signalwege gleichzeitig beeinflusst bei den leukämischen ABL-Onkogenen.

Von Hannemann et al. wurde darauf hingewiesen, dass eine Protein-Interaktionsdomäne bei TEL und BCR das Fusionsprotein stark oligomerisiert und somit die ABL-Kinase aktiviert. Ungeachtet der Sequenzunterschiedlichkeit von TEL und BCR wird dadurch die leukämische Transformation mit beeinflusst.

## 1.5. FLT3 und FLT3ITD in der Hämatopoese und Leukämie

FLT3 (=Ems-like tyrosine kinase 3) gehört zu der Klasse-III der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, wie auch KIT, FMS und PDGFR. Diese sind charakterisiert durch eine große Strukturähnlichkeit, wie z.B. in der extrazellulären Region mit fünf immunglobulinähnlichen Domänen und einer juxtamembranären Domäne, einer Kinase-Domäne, die bei allen durch eine Insertionsdomäne unterbrochen ist, und einer C-terminalen Domäne in der intrazellulären Region (MATTHEWS et al 1991). Das FLT3-Gen kodiert beim Menschen für ein aus 993 Aminosäuren bestehendes Protein, das in unreifen hämatopoetischen Zellen, in der Plazenta, den Gonaden und dem Gehirn exprimiert wird und ca. 140kD groß ist (MAROC et al. 1993 und deLAPEYRIERE et al. 1995). Im normalen Knochenmark scheint die Expression auf frühe CD34<sup>+</sup>-Stammzellen, frühe B-Zellen und Dendriten, die auch stark KIT exprimieren, begrenzt zu sein (RASKO et al. 1995). FLT3 wird auch in hämatologischen Neoplasien exprimiert, inklusive in 70-100% der AML aller FAB-Subtypen, bei der B-Zell ALL und einer kleineren Fraktion der T-Zell ALL (ROSNET et al. 1996).

Physiologischerweise wird FLT3 durch seinen Liganden, den FL (=FLT3-Ligand) aktiviert. FL ist ein Typ I Transmembranprotein, das als lösliches homodimeres Protein von Stromazellen des Knochenmarks oder von myeloischen und lymphatischen Stammzellen exprimiert wird (BRASEL et al. 1995 und LISOWSKI et al. 1996). Sowohl die membrangebundene Form als auch die lösliche Form kann die Tyrosin-Kinase-

Aktivität beeinflussen und das Wachstum der Vorläuferzellen im Knochenmark und im Blut stimulieren. Die Wirkung jedoch ist nicht so stark wie z.B. die von SF (=Steel Factor) auf KIT, deshalb ist die Stärke der Beeinflussung immer im synergistischen Zusammenhang mit anderen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren und Interleukinen zu sehen (LYMAN 1995). Ebenso weiß man aus Versuchen mit zielgerichteter Destruktion des FL-Gens in Mäusen, dass es zu einer signifikanten Beeinträchtigung des Immunsystems kommt, genauso wie zur Reduktion von myeloischen Vorläuferzellen. Ebenso wurde in-vivo eine signifikante Verminderung der B-Vorläuferzellen, der dendritischen Zellen und der natürlichen Killerzellen nachgewiesen (HUDAK et al. 1995).

Bindet FL an die extrazelluläre Domäne von FLT3, findet eine Konformationsänderung des Rezeptors statt, die eine Dimerisierung und Stabilisierung induziert (WEISS et al. 1998). Die Rezeptordimerisierung bringt die Kinase-Domänen in unmittelbare Nähe, und daraus folgt eine weitere Verstärkung der Kinase-Aktivität des Rezeptors. Diese aktivierte Kinase phosphoryliert und/oder bindet wiederum multiple Signaltransduktionsproteine, die die Zellproliferation und –differenzierung beeinflussen. Autoinhibitorische Effekte in der sogenannten „activation-loop“ in der Kinase-Domäne, die die ATP-Bindung blockiert und eine der juxtamembranären Domäne eigene helikale Konformation, verhindern eine Autoaktivierung des Rezeptors.

Nun berichtete Nakao et al. 1996 als Erster über das Vorhandensein von einer internen Tandemduplikation (ITD) in genau dieser juxtamembranären (JM) Domäne von FLT3 in der AML (NAKAO et al. 1996). Sie bemerkten, dass 17% der Patienten mit AML Längenpolymorphismen in der JM-Domäne aufwiesen. Sequenzanalysen der DNA der Erkrankten zeigten eine in-frame Längenmutation (ITD) in der JM-Domäne von FLT3.

Mittlerweile ist dieses Erkenntnis von vielen anderen Gruppen bestätigt worden, und man weiß, dass in 24% der AML-Erkrankungen die FLT3ITD-Mutation dafür verantwortlich ist (GILLILAND 2002). Deshalb wurde diese Längenmutation des FLT3-Rezeptors auch in dieser Arbeit verwendet, um die Rolle der STAT-Aktivierung durch den gesicherten pathogenen und leukämogenen Einfluss von FLT3ITD herauszuarbeiten.

## 1.6. Zielsetzung der Arbeit

Durch molekularbiologische Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen und auch durch Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe wurde festgestellt, dass in AML-Blasten Mitglieder aus der STAT-Familie, insbesondere STAT1, 3 und 5, konstitutiv aktiv sind. Im Hinblick auf die kritische Funktion der STAT-Moleküle sollten nun eingehender die Mechanismen deren Aktivierung beleuchtet werden. Hierzu sollten die Fusionsproteine und die FLT3-Längenmutation dienlich sein, denn deren pathogene und v.a. leukämogene Eigenschaften sind unbestritten, auch wenn nicht alle phänotypisch in eine AML münden.

Die im Folgenden genannten Punkte und deren Erklärung sind als Leitfaden zu sehen und so auch im Ergebnis-Teil der Arbeit wiederzufinden:

1. „Tyrosin-Phosphorylierung von STAT1, 3 und 5 durch leukämische PTK in 293-HEK-Zellen“ als Zellmodellsystem, das durch transiente Transfektion gut manipulierbar ist.
2. „Induktion von IL-3-unabhängigem Wachstum von Ba/F3-Zellen durch leukämische PTK“, um zu demonstrieren, dass diese ein transformierendes Potential besitzen in einem hämatologischen Zellmodell, den Pro-B-Vorläuferzellen Ba/F3.
3. „Tyrosin-Phosphorylierung von STAT1, 3 und 5 durch leukämische PTK in Ba/F3-Zellen“ als Bestätigung des in Punkt 1 gefundenen Effekts mit den in Punkt 2 stabil transfizierten und IL-3-faktorunabhängig wachsenden Ba/F3-Zellen.
4. „Konstitutiv aktives STAT3 und STAT5 induziert IL-3-unabhängiges Wachstum von Ba/F3-Zellen“ als Beweis dafür, dass STAT-Moleküle transformierendes und leukämogenes Potential besitzen.
5. „Einfluss des Inhibitors STI571 auf die Phosphorylierung der Fusionsproteine und von STAT5 in Ba/F3-Zellen“, um eine Möglichkeit der Einflussnahme in den entscheidenden Prozessen der STAT-Aktivierung aufzuzeigen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten einen Beitrag zur Klärung der Frage leisten, ob und wie die STAT-Aktivierung an der Pathogenese der AML beteiligt ist, und eine mögliche therapeutische Option in der Inhibierung dieses Signalweges aufzeigen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Zellkulturmethoden

Alle Zelllinien wurden in einem Zellkultur-Inkubator (Heraeus, Deutschland) bei 5% CO<sub>2</sub>, bei 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert.

#### 2.1.1. Materialien für die Zellkultur

Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)	PAN oder Gibco BRL, Deutschland
EDTA	Gibco BRL, Deutschland
Filtropur S02, Ø 0,2 µm	Sarstedt, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Plastikpipetten	Costar, Deutschland
Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAN, Deutschland
RPMI-1640	PAN, Deutschland
Streptomycin	Gibco BRL, Deutschland
Trypsin	Gibco BRL, Deutschland
Zellkulturverbrauchsmaterial	Sarstedt, Deutschland
Zellkulturplatten	Greiner, Deutschland

#### 2.1.2. Kultivierung verschiedener Zelllinien

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter Gerail-Sterilbänken durchgeführt. Medien und Zusätze wurden bei 4°C aufbewahrt und vor Verwendung auf Zimmertemperatur aufgewärmt. Mediumwechsel wurde bei allen Zelllinien im Abstand von 2-3 Tagen vorgenommen.

Dabei wurden Suspensionszellen 5 min bei 1000 U/min (Bremskraft: 9g; 20°C) mit einer Standzentrifuge zentrifugiert, der Überstand abgenommen, die Zellen in einem 10ml-Röhrchen in ihrem benötigten Medium resuspendiert und entsprechend ihres Wachstums gesplittet, in eine Kulturflasche gegeben und mit Medium gemäß dem Flaschenvolumen aufgefüllt.

Bei adhärenenten Zellen wurde zuerst das Medium abgenommen, der Zellrasen mit PBS gewaschen und anschließend wurden sie 5-7min mit Trypsin/EDTA im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die nun gelösten Zellen in PBS aufgenommen, 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen in ihrem Medium in einem 10ml-Röhrchen resuspendiert und entsprechend ihres Wachstums gesplittet. Danach wurden sie in eine Kulturschale gegeben und gemäß dem Volumen mit Medium aufgefüllt.

### **2.1.3. Bestimmung der Zelldichte**

Zur Bestimmung der Vitalität und Quantität der Zellen, wurde aus der zu zählenden Kulturflasche ein bestimmtes Volumen der Zellen mit Trypanblau im Verhältnis von 1:9 vermischt, und die vitalen Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer in einem Durchlichtmikroskop (Leitz, Deutschland) bestimmt.

### **2.1.4. Einfrieren und Auftauen von Zellvorräten**

Zur Konservierung der Zellen wurden Aliquots à  $1 \times 10^7$  Zellen in 1,5 ml aus 90% FCS und 10% DMSO in einem Cryo 1°C Freezing Container (Nalgene, Deutschland) nach Herstellerangaben bei -80°C eingefroren und nach 24h in einen Stickstofftank zur Lagerung überführt.

Durch Auftauen konnten die Zellen wieder in Kultur genommen werden. Das Auftauen erfolgte durch Schwenken der Röhrchen im 37°C warmen Wasserbad und Resuspendieren mit 10 ml Medium. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in

entsprechendem Medium in Kultur genommen. Erst nach Eintreten ihres typischen Wachstumsverhaltens wurden sie wieder für weitere Versuche verwendet.

### 2.1.5. Herstellung von WEHI-Überständen

Für die Gewinnung von WEHI-Überständen wurde das konditionierte Medium von den kultivierten WEHI-Zellen abgenommen und abzentrifugiert. Das von den WEHI-Zellen produzierte und ins Medium abgegebene IL-3 wurde somit zur Herstellung von Wachstumsfaktor enthaltendes Medium verwendet. Nach dem Sterilfiltrieren der Überstände wurden Aliquots zu je 50 ml bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Diese konnten dann als murine IL-3 Quelle verwendet werden.

### 2.1.6. Zelllinien

#### 2.1.6.1. 293HEK-Zellen

Zelltyp: humane, embryonale Fibroblasten der Niere  
Herkunft: DSMZ (Dt. Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH),  
Nr.: ATCC CRL 1573  
Morphologie: polymorphe, in Gruppen wachsende, einen zweidimensionalen  
Rasen bildende adhärente Zellen  
Wachstum: alle 2-3 Tage 1:6 bis 1:8 gesplittet

#### 2.1.6.2. Ba/F3-Zellen

Zelltyp: murine Pro-B-Zelllinie, entnommen aus dem peripheren Blut,  
IL-3-abhängig  
Herkunft: DSMZ, Nr.: ACC 300  
Morphologie: meist vereinzelte, runde, selten polymorphe Zellen, in Suspension  
wachsend (bei hoher Zelldichte gelegentlich gruppiertes Wachstum)  
Wachstum: alle 2-3 Tage 1:25 bis 1:35 gesplittet



### 2.1.7. Transfektion von Zellen

Die Präparation größerer DNA-Mengen wurde mit dem Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Deutschland) durchgeführt. Pro Ansatz wurden 200 ml LB-Übernachtskultur aufgereinigt. Von den Bakterienkulturen wurden je ein bis zwei Portionen (0,93 ml) mit DMSO (70 µl) versetzt und bei –80°C gelagert. Daraus konnten bei Bedarf, ohne erneute Transformation, Übernachtskulturen für weitere Maxipräparationen angesetzt werden. Anschließend wurde die Konzentration der DNA in [µg/µl] mit einem Messgerät (hier: A260/280) der Fa. Pharmacia Biotech (Gene Quant II, RNA/DNA Calculator) anhand geeichter Lösungen gemessen.

#### 2.1.7.1. Transiente Transfektion von 293HEK-Zellen

Je nach Versuchsansätzen wurden die 293-HEK-Zellen entweder in P10-Schalen mit 2,2 Mio. oder in 6-wells mit 0,36 Mio. Zellen nach dem Calcium-Phosphat- Protokoll transfiziert. Hierzu wurden die Zellen morgens nach der Zählung mit der Neubauer-Zählkammer ausgesät und nachmittags der Transfektionsmix zugegeben.

Transfektionsmix:	P10	6-Well
H <sub>2</sub> O [µl]	264	88
DNA [µl von 1µg/µl Stock]	6	2
CaCl <sub>2</sub> 2,5M [µl]	30	10
2xBBS [µl]	300	100

Bei der Verwendung eines anders konzentrierten DNA-Stocks ist das Volumen des H<sub>2</sub>O anzupassen. Der Transfektionsmix ist auf Eis zu pipettieren. Bevor man den Mix in die Schalen gibt, ist er vorher ca. 20-30min auf Raumtemperatur gestanden. Die Transfektionsschalen wurden über Nacht bis längstens 24h in den Inkubator gestellt, und danach wurde ein Medienwechsel vorgenommen. Bevor die Zellen nach ca. 36-48h lysiert wurden, wurden sie 4h in ein Hungermedium gegeben, das nur 0,4% FCS enthält.

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde eine mitlaufende Schale mit der DNA von GFP (green phosphorylating protein) transfiziert, die dann, bevor die eigentlich für den Versuch transfizierten Zellen lysiert wurden, unter einem speziellen UV-Lichtmikroskop betrachtet wurden. Hierbei sollte, um eine hinlängliche Proteinausbeute der transfizierten Zellen erreicht zu haben, die Anzahl der im Blickfeld grün leuchtenden Zellen ca. 30-50% der Gesamtmenge sein.

#### 2.1.7.2. Stabile Transfektion von Ba/F3-Zellen

Für die stabilen Transfektionen mit BCR-ABL, TEL-ABL, TEL-JAK2 sowie dem leeren Vektor als MOCK-Kontrolle wurden Ba/F3-Zellen verwendet. Diese Zelllinien waren in unserer Arbeitsgruppe durch Elektroporation (Easyject Plus, Peqlab, Erlangen, Deutschland) von nativen Ba/F3-Zellen mit pCDNA6A-BCR-ABL, -TEL-ABL, -TEL-JAK2, -FLT3ITD-Konstrukten und anschließender Blasticidin-Selektion [8 µg/ml] generiert worden (Ruth Schwab). Hierzu wurden  $4 \times 10^6$  Zellen in 400 µl Medium mit 30 µg entsprechender Plasmid-DNA resuspendiert und mit elektrischen Stromimpulsen von 330V und 950 µF elektroporiert. Zur Selektion der Zellen der Blasticidin-Resistenz enthaltenden Plasmid-DNA wurden 48h nach Elektroporation 8 µg Blasticidin pro ml ins Medium zugegeben. Zur Selektion des IL-3 Faktor unabhängigen Wachstums wurden die transfizierten Ba/F3-Zellen mit WEHI-freiem Medium nach dem siebtem Tag der Elektroporation kultiviert.

#### 2.1.8. Proliferationsassays

Diese Assays wurden mit nativen Ba/F3-Zellen, die stabil mit TEL-ABL-, TEL-JAK2- und BCR-ABL-Konstrukten transduziert wurden, durchgeführt und mit den MOCK-transfizierten und IL-3 abhängigen Ba/F3-Zellen als Referenzwert verglichen.

Für Proliferationsassays wurden die Zellen in einer Dichte von  $0,5 \times 10^6$  Zellen in 3,0 ml Medium in 6-Loch-Platten (Flachboden) ausgesät. Es wurden je Zeitpunkt und Konstrukt drei Löcher einer 6-Loch-Platte ausgesät. Des Weiteren wurden die MOCK-transfizierten Zellen in diesem Assay mit rekombinantem Interleukin-3 (IL-3; 10ng/ml)

(Biosource International, USA) angesetzt. Das Wachstum der Zellen wurde nach 24 und 48 Stunden durch Trypanblau-Färbung und Auszählung der vitalen Zellen bestimmt. Proliferationsassays für die unter 2.1.7.2 beschriebenen transfizierten Ba/F3-Zelllinien wurden in Abwesenheit von IL-3 angesetzt, um Spontanproliferationen bestimmen zu können.

### 2.1.9. Selektive PTK-Inhibitoren

#### 2.1.9.1. AG 490

Das Tyrphostin AG490 (Fa. Calbiochem, Katalog-Nr.: 658401) wurde nach Herstellerangaben in DMSO zu einer Stocklösung von 20mmol/l aufbereitet und in dieser Form nicht länger als einen Monat verwendet. Dabei wurde die Stocklösung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### 2.1.9.2. STI 571

Fr. Dr. Elisabeth Buchdunger (Fa. Novartis Pharma, Basel, Schweiz) stellte freundlicherweise das STI 571 zur Verfügung. Dabei wurden Stocklösungen zu 10mmol/l in PBS aufbereitet und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

## 2.2. Biochemische Methoden

### 2.2.1. Lösungen und Puffer

- **2xBBS:** 280mM NaCl  
1,5mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$   
50mM BES = N,N-bis-[2-Hydroxyethyl]-2-aminoethansulfonicacid  
 $\text{H}_2\text{O}$  bidest  
pH auf 6,95 ( $20^{\circ}\text{C}$ ) einstellen und mehrmals kontrollieren

- *RIPA-Puffer (10ml):*

TRIS-HCl 500mM pH7,4	1,0ml
NP-40	100 µl
Deoxycholat	1,0ml
NaCl 1,5M	1,0ml
EGTA 10mM pH7,0	1,0ml
bidest H <sub>2</sub> O	5,5ml
PMSF 100mM	100 µl
Orthovanadat 100mM	100 µl
Aprotinin 1mg/ml	10 µl
Leupeptin 1mg/ml	10 µl
Pepstatin 0,1mg/ml	100 µl
NaFl 100mM	100 µl
  
- *HEPES-Puffer: Stock (500ml):*

1M HEPES pH7,5	25ml
5M NaCl	15ml
200mM EGTA	2,5ml
50% Glycerol	100ml
Triton x 100	5ml
NaFl	2,1g
Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> x 10H <sub>2</sub> O	2,23g

für 10ml frischen Puffer wurde hinzupipettiert:

Aprotinin (x200)	50µl
PMSF 0,1M	100µl
Orthovanadat 0,1M	100µl
  
- *Lämmli-Puffer:*

187,5 mM Tris
6% SDS
30% Glyzerin
Bromphenolblau
  
- *Lämmli-DTT-Puffer:*

2,5 ml Lämmli-Puffer
0,6 g DTT (Dithiothreitol)

### 2.2.2. Lyse von Zellen

293HEK-Zellen wurden mit RIPA-Puffer und Ba/F3-Zellen mit HEPES-Puffer lysiert. Das Volumen des Lysis-Puffers richtete sich nach der Zelldichte, von 300µl/6-Well und 500µl/P10-Schale und bei großen Ba/F3-Kulturflaschen bis zu 1,0ml. Das Medium wurde bei 293HEK-Zellen abgesaugt und mit PBS gewaschen, so dass sich die Zellen vom Boden der Kulturschale gelöst haben. Anschließend wurde 5min zentrifugiert bei 1000U/min, der Überstand verworfen und die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert. Ba/F3-Zellen hingegen wurden 5min bei 1000U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet vorsichtig mit PBS gewaschen. Der Überstand wurde wiederum verworfen und die Ba/F3-Zellen hingegen mit HEPES-Puffer lysiert. Das Lysat beider Zelllinien wurde anschließend bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert, dann bei 13200U/min zentrifugiert, um ungelöste Zellbestandteile zu entfernen. Ein Aliquot wurde zur Proteinbestimmung eingesetzt, die anderen bei -20°C eingefroren oder direkt für Versuche verwendet.

### 2.2.3. Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt wurde nach dem Protokoll von Bradford (1976) bestimmt. Dazu wurde zuerst eine Proteinstandardkurve aus einem BSA-Stock [1mg/ml] mit der Verdünnungsreihe von 1:10 bis 8:10 mit H<sub>2</sub>O erstellt. Unter Zuhilfenahme der Bradford-Reagenz (Dye von BioRad, Deutschland) und von Halbmikroküvetten (Fa. Sarstedt) wurde im Photometer, das eingestellt wurde auf Wellenlänge von 595nm, die Extinktion gegen einen Leerwert (nur Bradford-Reagenz) gemessen. Anschließend wurde auf ein Millimeterpapier eine Standardeichkurve aufgezeichnet, deren Abszisse die Extinktion [dimensionslos] und die Ordinate den Proteingehalt in [mg/ml] angibt. Die Aliquots der zu messenden Proben wurden nun ebenfalls wie die BSA-Standardreihe aufbereitet, und wiederum wurde gegen den Leerwert im Photometer mit derselben Wellenlänge die Extinktion gemessen. Durch einen Abgleich konnte somit anhand der Eichkurve die Proteinmenge bestimmt werden.

#### 2.2.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Zell-Lysaten wurde in 12%igen Polyacrylamidgelen und 7,5-12,5%igen Polyacrylamid-Gradientengelen durchgeführt. Die dafür benötigten Geräte waren ein Gradientenmischer, eine vertikale Elektrophorese-Kammer (Protean II xi; Biorad, Deutschland) und ein Netzgerät (Consort E333, Deutschland).

Das Trenngel wurde hergestellt, indem eine 12,5%ige Gellösung (3ml Saccharose; 2,9 ml Aqua dest.; 5,65 ml Tris pH 8,8 ohne SDS; 6,25 ml Acrylamid (Roth, Deutschland); 75 µl 20% SDS (Sigma, Deutschland)) in die Mischkammer und eine 7,5%ige Gellösung (5,4 ml Aqua dest.; 5,65 ml Tris pH 8,8 ohne SDS; 3,75 ml Acrylamid (Roth, Deutschland); 75 µl 20% SDS (Sigma, Deutschland)) in die Reservoirkammer des Gradientenmischers pipettiert wurden. Durch Zugabe von je 50 µl 10%igem APS (Ammoniumpersulfat; Sigma, Deutschland) und je 3 µl TEMED (N',N',N',N'-Tetramethylethyldiamin; Sigma, Deutschland) wurde die Polymerisationsreaktion gestartet. Für die 12%igen Gele wurde eine entsprechende Gellösung nur in die Mischkammer pipettiert.

Durch Höherstellen des Gradientenmischers (Schwerkraft) konnte das Gel bis zur gewünschten Höhe gegossen werden. Dann wurde das Gel mit Aqua dest. überschichtet, um ein Austrocknen des Gels während der Polymerisation zu verhindern. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Trenngel mit einem 4%igen Sammelgel – bestehend aus 6,1 ml Aqua dest.; 2,5 ml 0,5M Tris-HCl pH 6,8 ohne SDS; 1,3 ml Acrylamid; 100 µl 10% SDS; 50 µl APS; 10 µl TEMED – überschichtet, und der benötigte Gelkamm wurde eingesetzt.

Nach der Polymerisierung wurden die Proben für die Elektrophorese vorbereitet. Hierfür wurden je 50-80µg Protein/Probe mit dem gleichen Volumen Lämmli-DTT-Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 95°C im Heizblock gekocht. Die denaturierten Proben wurden für 1 Minute bei 9000 rpm abzentrifugiert und, nach Auffüllen der Geltaschen mit Elektrophoresepuffer, auf die Gele aufgetragen.

Um die Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine bestimmen zu können, wurde ein Gemisch von Molekulargewichtsmarken (*LMW*, low molecular weight calibration kit, Amersham, England; *HMW*, SDS-Page molecular weight standards broad range, BioRad, Deutschland) als Referenz aufgetragen:

HMW		LMW	
Myosin	200,0 kDa		
$\beta$ -Galactosidase	116,25 kDa		
Phosphorylase b	97 kDa	Phosphorylase b	97 kDa
Serum Albumin	66 kDa	Albumin	66 kDa
Ovalbumin	45,0 kDa	Ovalbumin	45,0 kDa
Carboanhydrase	30 kDa	Carboanhydrase	30 kDa
Trypsin Inhibitor	21,1 kDa	Trypsin Inhibitor	20,1 kDa
Lysozyme	14,4 kDa	$\alpha$ -Lactalbumin	14,4 kDa
Aprotinin	6,5 kDa		

Die Geltaschen wurden mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt und über Nacht bei 28-30 mA aufgetrennt. Am nächsten Tag wurde die Elektrophorese solange fortgeführt, bis die Lauffront des Bromphenolblau-Markers (im Lämmli-DTT-Puffer enthalten) das Ende des Trenngels erreicht hatte.

## 2.3. Immunologische Methoden

### 2.3.1. Lösungen und Puffer

*10x Transblot (1l):* 72,75 g Tris; 36,63 g Glycin; 0,475 g SDS  
für *1x Transblot* wurde noch 20% Methanol zugefügt

*2% Trichloressigsäure:* 10 ml Trichloressigsäure auf 500 ml Aqua dest.

*Ponceau-Rot:* 1 g Ponceau S in 500 ml 2% Trichloressigsäure lösen;  
dunkel aufbewahren

<i>10x NET:</i>	1,5 M NaCl; 0,05 M EDTA pH 8; 0,5 M Tris pH 7,5; 0,5% Triton X-100
<i>1x G-NET:</i>	2,5 g Gelatine wurden in 100 ml 10x NET gelöst, aufgekocht und gerührt, bis eine klare Lösung vorhanden war. Diese wurde mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt.
<i>10x TBS:</i>	10 mM Tris pH 8; 150 mM NaCl
<i>1x TBS-T:</i>	100 ml 10x TBS; 0,2% Tween 20; Aqua dest. ad 1 l
<i>3x TBS-T:</i>	300 ml 10x TBS; 15 ml Tween 20; Aqua dest. ad 1 l
<i>Strippinglösung:</i>	800 ml 3x TBS-T; 20 ml $\beta$ -Mercapthoethanol; 200 ml 10% SDS
<i>4x HNTG-Puffer:</i>	200 mM HEPES pH 7,5; 600 mM NaCl; 0,4% Triton X-100; 40% Glycerol

Falls nicht anders erwähnt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Sigma (Deutschland), Merck (Deutschland) und Roth (Deutschland) bezogen.

### 2.3.2. Immunopräzipitation

Das zugrundeliegende Prinzip ist das Ausfällen der zu untersuchenden Proteine mit Hilfe eines Komplexes, der eine leichte Bindung zum spezifischen Antikörper eingeht. Somit bindet an das Protein der Antikörper und an diesen wiederum dieser Komplex. Zum Präzipitieren wurde ein Eiweiß-Zucker-Komplex, je nach Antikörper entweder Protein-Sepharose A oder G (monoklonal = Protein G-Sepharose (Amersham, Schweden); polyklonal = Protein A-Sepharose (Upstate, USA)), verwendet. Hierzu wurde der Antikörper je nach Proteinmenge zwischen 7-10  $\mu$ l mit der Protein-Sepharose ca. 20min bei Raumtemperatur vorinkubiert, dann das definierte Lysat (zwischen 300 $\mu$ g und 0,5mg mit Lysispuffer auf ein bestimmtes Volumen eingestellt) dazugegeben und



entweder 4h oder über Nacht auf dem Drehrad auf langsamer Stufe bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 1xHNTG gewaschen, d.h. zuerst mit 13.200 U/min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit 0,5ml/Probe das Pellet vorsichtig resuspendiert. Dieser Vorgang wurde 3 mal durchgeführt. Die im Pellet befindliche Protein-Sepharose wird nun gelöst, indem 20µl Lämmli-DTT-Puffer zugegeben und vorsichtig mit leichten Antippen vermischt wird, die Probe bei 95°C 5-10min lang gekocht und anschließend abzentrifugiert wird, so dass die schweren Bestandteile sich im Pellet befinden und im Überstand die zu untersuchenden Proteine. Dieser kann nun entweder direkt auf das SDS-Page gegeben oder bei -20°C eingefroren werden.

### 2.3.3. Immunoblot

Die nach Towbin et al. (1979) modifiziert durchgeführte Methode des Immuno- oder Western-Blottings basiert auf einem Elektrotransfer der Proteine vom SDS-Polyacrylamidgel (s. 2.2.4) auf eine Nitrozellulosemembran (Protran, Porengröße 0,45µm, Schleicher & Schüll, Deutschland).

Die Nitrozellulosemembran (15x16 cm) wurde zusammen mit sechs gleich großen Stücken Filterpapier (Blottingpapier, Schleicher & Schüll, Deutschland) in Transblotpuffer äquilibriert. Dann wurde das Transfersandwich in der Semi-Dry-Elektrophorese Transferkammer (Trans-Blot SD, BioRad, Deutschland) wie folgt zusammengebaut: 3 Filterpapiere; Membran; SDS-Gel; 3 Filterpapiere.

Die Kathodenplatte und der Deckel wurden aufgesetzt, und das Gerät wurde an ein Netzgerät (PowerPac 200, BioRad, Deutschland) angeschlossen. Der Transfer erfolgte bei 250 mA für drei Stunden.

Danach wurde die Membran kurz mit Aqua dest. gespült und mit Ponceau-Rot-Lösung angefärbt. Der Hintergrund wurde durch vorsichtiges Spülen mit Aqua dest. wieder entfärbt. Nach dem Anzeichnen der Marker waren die Proteinbanden auf dem Blot nun gut zu erkennen und konnten nach Fotokopieren zur Quantifizierung herangezogen werden.

Für die Immunfärbung musste der Blot erst eine Stunde in G-NET (Blockierungslösung), unter Schütteln, blockiert werden. Danach wurde der Blot mit dem entsprechend

verdünnten primären Antikörper in G-NET über Nacht bei 4°C, unter Schütteln, inkubiert.

Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurde der Blot dreimal für je 15 Minuten in TBST gewaschen. Danach folgte eine einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1:20000 in G-NET verdünntes HRPO (horse radish peroxidase) - gekoppeltes anti-Kaninchen- oder anti-Maus-Immunglobulin, Santa Cruz bzw. BioRad, Deutschland) bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Blot dreimal für je 15 Minuten in TBS-T und 10 Minuten in PBS gewaschen. Für die Detektion wurde ein ECL (enhanced chemiluminescence)-Kit von Amersham verwendet. Der Blot wurde für eine Minute in Substratlösung inkubiert und in eine Klarsichtfolie verpackt. Auf den Blot wurde ein Röntgenfilm (Hyperfilm<sup>TM</sup>ECL<sup>TM</sup>, Amersham, England) in einer Filmkassette (Hypercassette<sup>TM</sup>, Amersham, England) bis zu einer Stunde exponiert.

#### **2.3.4. Stripping von Immunoblot**

Das Stripping von Immunoblots diente dazu, die auf der Nitrozellulosemembran in Bindung befindlichen Antikörper von den Zielproteinen abzuwaschen, ohne diese in ihrer Form zu verändern.

Hierzu wurden 2x50ml Stripping-Lösung im entsprechenden Eppendorf-Gefäß auf 65°C erhitzt und die erste Portion auf die in einem Behälter befindliche NC-Membran gegeben und 15min bei Raumtemperatur geschwenkt. Danach wurde die zweite Portion dazugegeben und nochmals für 15min inkubiert.

Anschließend wurde, um das  $\beta$ -Mercaptoethanol zu beseitigen, die NC-Membran mit 3xTBST 20min gewaschen und dann für 60min, wiederum schwenkend, mit G-NET blockiert.

## 2.4. Antikörper

anti-FLT3/flk2	S18, sc 480, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
anti-c-abl	clone 24-11, sc 23, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
anti-myc	clone 9E10, sc 40, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
anti-Stat 1	sc 364, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
anti-Stat 3	sc 482, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
anti-Stat 5	sc 835, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
anti-Phosphotyrosin	sc 7020, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
anti-Phospho-Stat1,3 und 5	zur Verfügung gestellt von D.A. Frank, Boston, Massachusetts, USA
anti- $\beta$ -Aktin	Sigma 5441, Sigma, Deutschland

## 2.5. Plasmid-DNA

pEFBosHA-STAT3-wt	Masahiko Hibi, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan
pEFBosH4-STAT1-wt	Masahiko Hibi, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan
pCI-STAT5A-wt	Warren J. Leonard, Chief Molecular Immunology, National Institute of Health, USA
pCDNA6A	Fa. Invitrogen, Deutschland
pCDNA6A-BCR/ABL	Karsten Spiekermann, KKG-Leukämie, GSF-Hämatologikum, München, Deutschland; BCR/ABL ursprünglich: Markus Warmuth KKG-Gentherapie, GSF-Hämatologikum, München, Deutschland

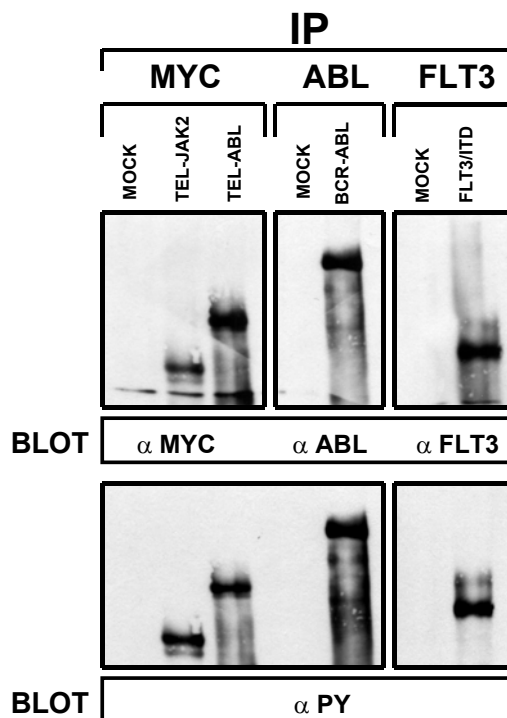
---

pCDNA6A-TEL/ABL	Karsten Spiekermann, KKG-Leukämie, GSF-Hämatologikum, München, Deutschland
pCDNA6A-TEL/JAK2	Karsten Spiekermann, KKG-Leukämie, GSF-Hämatologikum, München, Deutschland
pCDNA6A-FLT3ITD	Karsten Spiekermann, KKG-Leukämie, GSF-Hämatologikum, München, Deutschland
RCCMV-STAT3C-FLAG	Jacqueline Bromberg, Rockefeller Universität, New York, USA
pMX-STAT5A1*6	Mayumi Onishi, DNAX Research Institute of Molecular and Cell Biology, Palo Alto, California, USA

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Tyrosin-Phosphorylierung von STAT 1, 3 und 5 durch leukämische PTK in 293HEK-Zellen

Um die Mechanismen der konstitutiven STAT-Aktivierung in der AML untersuchen und charakterisieren zu können, wurden hinlänglich bekannte leukämische Phosphotyrosinkinasen (PTK) in ein gut modulierbares Zellsystem transfiziert. Hierzu wurde die DNA von den translozierten Fusionsgenen TEL-JAK2, TEL-ABL, BCR-ABL und einer aktivierenden Mutante des FLT3-Rezeptors, dem FLT3ITD, in das Plasmid pcDNA6A kloniert und in 293HEK-Zellen transient transfiziert. Die translatierten Proteine konnten nach Immunopräzipitation (IP) entweder mithilfe von spezifischen Antikörpern (AK) oder mit Phosphotyrosin-AK gut detektiert werden (Abbildung 2A oberer Teil). Des Weiteren waren alle Fusionsproteine und die FLT3-Mutation nach der IP konstitutiv Tyrosin-phosphoryliert (Abbildung 2A unterer Teil).

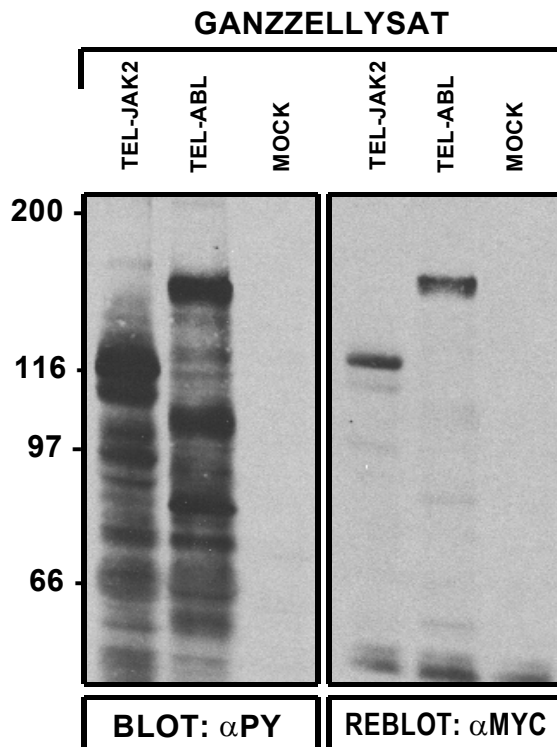


**Abbildung 2A:**

Expression der leukämischen Fusionsproteine mit PTK-Aktivität in 293HEK-Zellen:

Immunopräzipitation (IP) von myc-TEL-JAK2, myc-TEL-ABL mit dem 9E10-AK, von BCR-ABL mit dem monoklonalen c-abl-AK und von FLT3ITD mit einem polyklonalen S-18-AK. Die Blots wurden mit anti-myc/abl/flt3 inkubiert (oberer Teil), gestrippt und mit dem anti-phosphotyrosin-AK (PY99) gefärbt.

Ebenso ließen sich sogar im Ganzzelllysats die Fusionsproteine TEL-JAK2 und TEL-ABL mit dem spezifischen AK gegen den *myc-tag* gut detektieren, weil dieser schon bei geringer Proteinmenge über starke Bindungen zu seinem Antigen verfügt. Vorher wurde selbige NC-Membran mit dem Phosphotyrosin-AK inkubiert und anschließend gestrippt (Abbildung 2B).

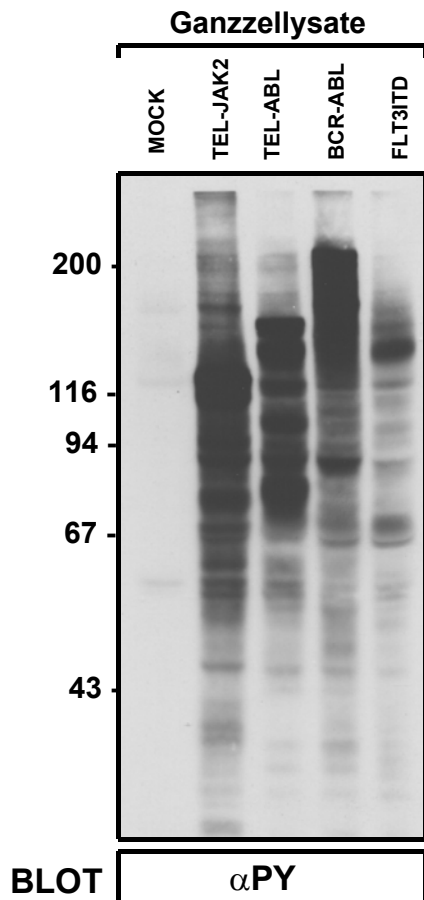


**Abbildung 2B:**

293HEK-Zellen wurden mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -Phosphat-Transfektion mit dem Vektor alleine, mit TEL-JAK2 und mit TEL-ABL transient transfiziert und nach 48h lysiert. 50µg Protein wurden auf ein 7,5-12,5% Gradientengel gegeben, geblottet und mit dem anti-phosphotyrosin-AK (PY99) inkubiert. Anschließend wurde die NC-Membran gestrippt und mit dem anti-myc-AK (9E10) gefärbt.

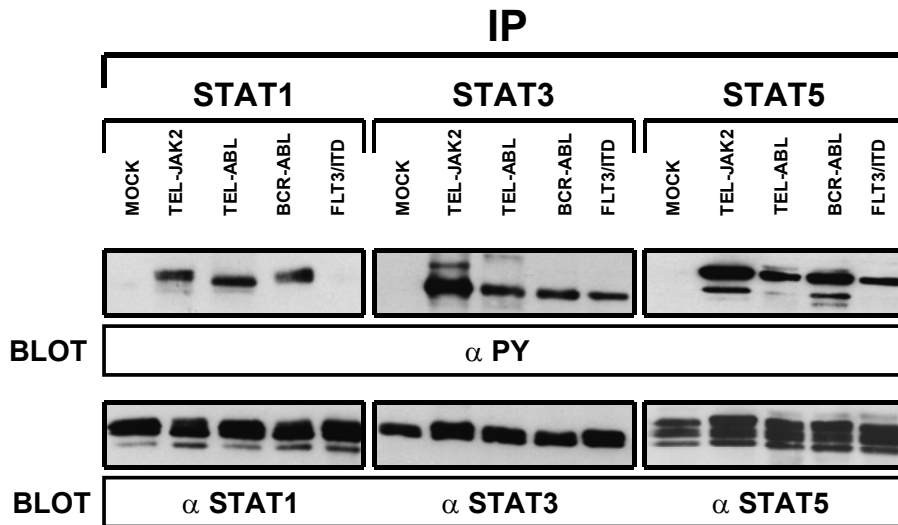
Die transient transfizierten Fusionsproteine induzierten dabei eine vielfältige Aktivierung bzw. Phosphorylierung von nachgeschalteten Zielproteinen, was mit dem Phosphotyrosin-AK in Ganzzelllysaten gezeigt werden konnte (Abbildung 2).

Hierbei zeigte sich bei den Fusionsproteinen TEL-JAK2, TEL-ABL und BCR-ABL eine annähernd gleich starke, die FLT3-Mutation hingegen eine schwächere Tyrosin-Phosphorylierung. Die MOCK-Transfektion, also der reine Leervektor, weist bei den gewählten Expositionszeiten so gut wie keine Phosphorylierung von nachgeschalteten Zielproteinen auf.

**Abbildung 3:**

293-Zellen wurden mittels Calcium-Phosphat-Transfektion mit dem Vektor alleine (=MOCK), mit TEL-JAK2, TEL-ABL, BCR-ABL und FLT3ITD transient transfiziert und nach 48h lysiert. Nach Proteinmessung der Lysate wurden 50µg Protein auf ein 7,5-12,5% Gradientengel gegeben, und nach dem Blotten die NC-Membran mit dem anti-phosphotyrosin-AK (PY99) gefärbt.

Um nun den Einfluss leukämischer Phosphotyrosinkinasen (PTK) auf die STAT-Aktivierung zu verdeutlichen, wurden in 293HEK-Zellen die darzustellenden Proteine überexprimiert, d.h. TEL-JAK2 wurde jeweils zusammen mit STAT1, 3 und 5, TEL-ABL, BCR-ABL, FLT3ITD und die MOCK-Kontrolle ebenso mit STAT1, 3 und 5 transient kotransfiziert (siehe Abbildung 4). Mithilfe dieser Überexpression konnte mit der IP durch STAT-spezifische Antikörper eine starke Zunahme der STAT3- und 5-Aktivierung aller PTK und ebenso eine STAT1-Aktivierung bei TEL-JAK2, TEL-ABL und BCR-ABL, nur nicht bei FLT3ITD, festgestellt werden. Dabei fällt auf, dass TEL-JAK2 bei STAT3 und 5, verglichen mit TEL-ABL, BCR-ABL und FLT3ITD, die stärkste Aktivitätssteigerung induzierte. Im unteren Teil der Abbildung 3 konnte gezeigt werden, dass sich die Proteinmengen von STAT1, 3 und 5 kaum unterscheiden, d.h. die Aktivitätsunterschiede im oberen Teil der Abbildung durch den Einfluss der PTK bedingt werden.



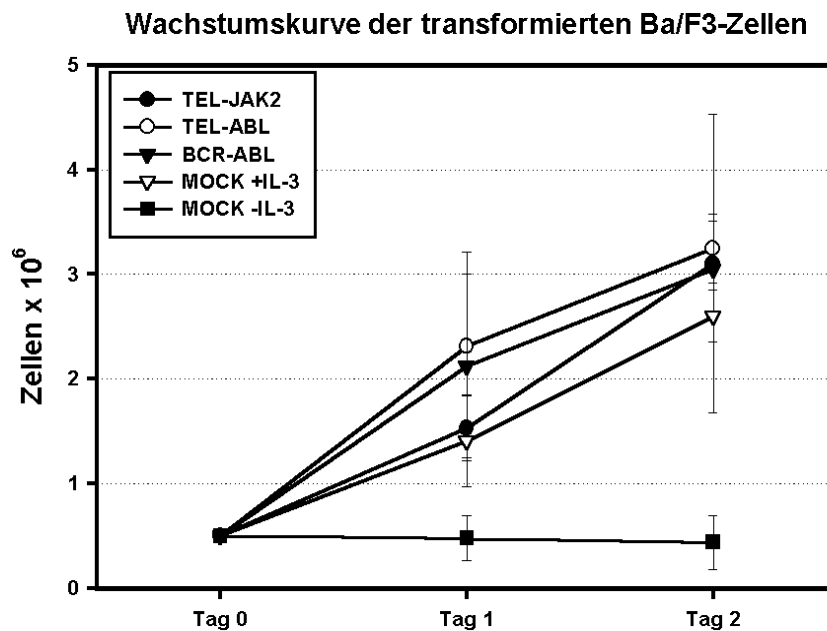
**Abbildung 4: STAT-Aktivierungsmuster leukämischer PTK in 293HEK-Zellen**

In 293HEK-Zellen wurden transient jeweils der Vektor allein, TEL-JAK2, TEL-ABL, BCR-ABL und FLT3ITD mit jeweils STAT1, STAT3 und STAT5 kotransfiziert. 1mg Lysat wurde mit den spezifischen STAT-Antikörpern immunopräzipitiert. Die Proteine wurden in einem 7,5-12,5% Gradientengel aufgetragen, auf eine NC-Membran geblottet, mit dem anti-phosphotyrosin-AK (PY99) inkubiert, gestrippt und nochmals mit den STAT-AK inkubiert.

### 3.2. Induktion von IL-3-unabhängigem Wachstum von Ba/F3-Zellen durch leukämische PTK

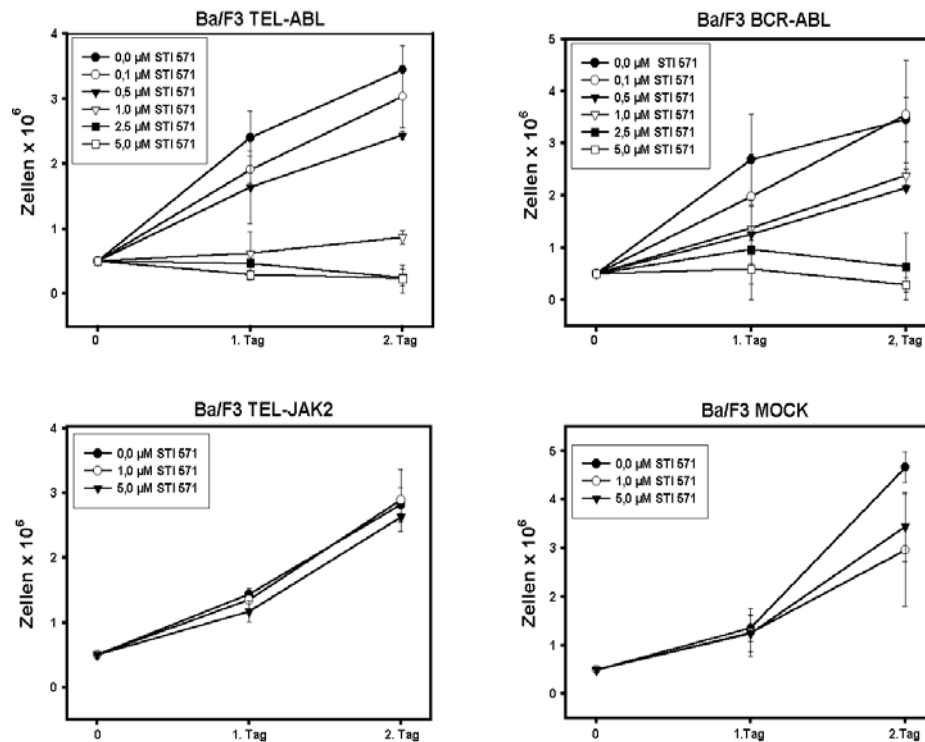
Um eingehender das Potential der STAT-Aktivierung durch Fusionsproteine leukämischer PTK untersuchen zu können, wurde ein gewebespezifischeres Zellsystem benutzt. Hierzu wurden TEL-JAK2, TEL-ABL, BCR-ABL und FLT3ITD in IL-3-abhängigen Ba/F3-Zellen durch Elektroporation stabil transfiziert. Hierbei zeigte sich bei allen Fusionsproteinen außer bei FLT3ITD ein stabiles IL-3-faktorunabhängiges Wachstum. Selbst nach mehrfachen Veränderungen der Versuchsbedingungen ließ sich im Zuge dieser Arbeit die FLT3ITD-Mutation nicht stabil transfizieren, so dass sich in Abbildung 5 nur die Wachstumskurven von TEL-JAK2, TEL-ABL und BCR-ABL im Vergleich zu nativen Ba/F3-Zellen zeigen ließ.



**Abbildung 5:**

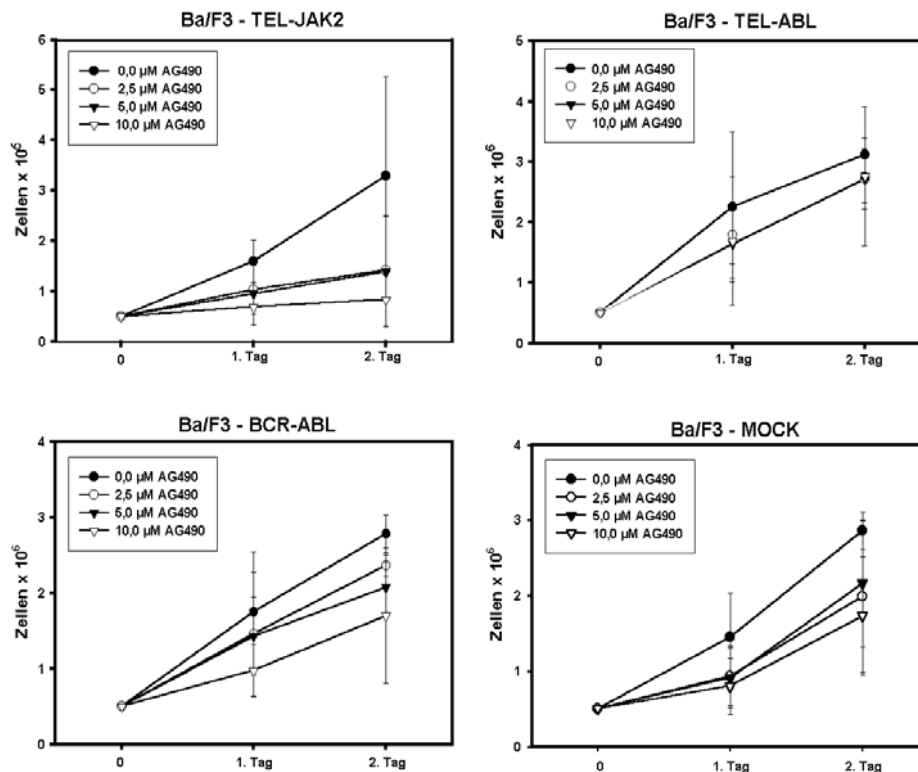
Transformierung der IL-3-abhängigen BA/F3-Zellen durch TEL-JAK2, TEL-ABL und BCR-ABL zu IL-3-unabhängigem Wachstum nach Selektion der Zellen mit Blasticidin enthaltendem Medium. Repräsentatives Ergebnis nach drei voneinander unabhängigen Zählungen.

Es zeigte sich ein stärkeres Wachstum der mit den Fusionsproteinen transfizierten faktorunabhängigen Ba/F3-Zellen im Vergleich zur nur vektortransfizierten MOCK-Kontrolle mit IL-3-Zusatz. Der schwächere Anstieg am zweiten Tag ist zurückzuführen auf die von vornherein hohe Anfangszahl der Zellen am Tag 0 und konsekutiv die überhöhte Dichte der Zellen in den 6-Well-Platten am Tag 2. Die negative Wachstumsrate der MOCK-Kontrolle ohne IL-3 macht deutlich, dass der Vektor alleine kein transformierendes Potential besitzt. Zu beweisen war noch, dass keine Sekundärmutation bei den stabil mit Fusionsproteinen transfizierten Ba/F3-Zellen ursächlich an der transformierten Faktorunabhängigkeit beteiligt war. Hierzu wurden die bekannten Inhibitoren STI571 und AG490 benutzt. STI571 ist bekannt als Hemmstoff der PTK-Aktivität von ABL-, KIT- und PDGF-Rezeptoren und das Tyrphostin AG490 als spezifischer Inhibitor von JAK2. Wie aus der Abbildung 6 hervorgeht, hatte STI571 schon bei geringsten Konzentrationen einen wachstumshemmenden Einfluss auf die TEL-ABL- und BCR-ABL-transfizierten BA/F3-Zellen, und bei 1,0-5,0µM STI571 wurde das Wachstum gänzlich aufgehoben; hingegen hatte es bei den TEL-JAK2- und MOCK-transfizierten Zellen selbst bei hohen Konzentrationen keinen Einfluss auf die Proliferation. Aus der Abbildung 7 lässt sich gleiches ableiten: Das AG490 hatte als selektiver JAK2-Inhibitor nur entscheidenden Einfluss auf die Proliferation von TEL-JAK2-transfizierten Zellen und keinen auf die übrigen, selbst

**Abbildung 6:**

Ba/F3-Poolzellen wurden ohne IL-3 (BCR-ABL, TEL-ABL, TEL-JAK2) und mit IL3 (MOCK) zu jeweils  $0,5 \times 10^6$  Zellen in einem Medium ausgesät, das die Konzentration STI571 enthielt, wie in der Legende abgebildet, und am 1. und 2. Tag mit der Neubauer-Kammer gezählt. Repräsentatives Ergebnis mit Standardabweichung nach drei voneinander unabhängigen Zählungen.

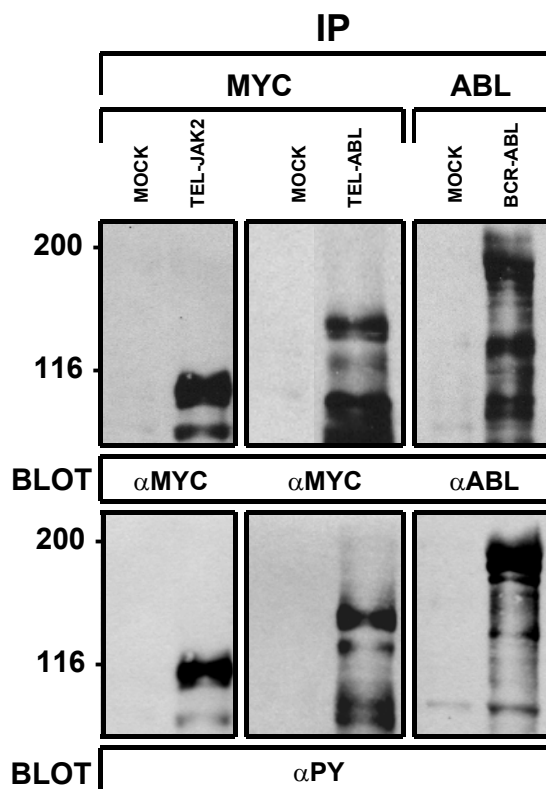
bei hohen Konzentrationen von  $10,0 \mu\text{M}$  AG490 nicht. Zusammenfassend: Es ließ sich zeigen, dass die faktorunabhängige Proliferation der transfizierten Ba/F3-Zellen allein auf die Präsenz der transformierenden Phosphotyrosinkinase zurückzuführen ist und nicht durch andere Mutationen verursacht und unterhalten wurde.

**Abbildung 7:**

Ba/F3-Poolzellen wurden ohne IL-3 (BCR-ABL, TEL-ABL, TEL-JAK2) und mit IL3 (MOCK) zu jeweils  $0,5 \times 10^6$  Zellen in einem Medium ausgesät, das die Konzentration AG490 enthielt, wie in der Legende abgebildet, und am 1. und 2. Tag mit der Neubauer-Kammer gezählt. Repräsentatives Ergebnis mit Standardabweichung nach drei voneinander unabhängigen Zählungen.

### 3.3. Tyrosin-Phosphorylierung von STAT 1, 3 und 5 durch leukämische PTK in Ba/F3-Zellen

Im Unterschied zu dem in 3.1. gezeigten Zellsystem, sollte hier das Muster der STAT-Aktivierung in einem gewebespezifischeren Zellsystem untersucht werden. Hierzu wurden die Ba/F3-Poolzellen mit den stabil transfizierten Fusionsproteinen verwendet und mit der entsprechenden MOCK-Transfektion verglichen. Vorweg wurde der Nachweis der Präsenz der PTK mithilfe der IP und der schon unter 3.1. benutzten spezifischen Antikörper, wie aus Abbildung 7 (oberer Teil) ersichtlich, geführt. Zusätzlich wurde noch die Tyrosinphosphorylierung nach dem Strippen der Membran getestet (unterer Teil der Abbildung 7). Dabei wurde ersichtlich, dass die Fusionsproteine konstitutiv tyrosinphosphoryliert sind.



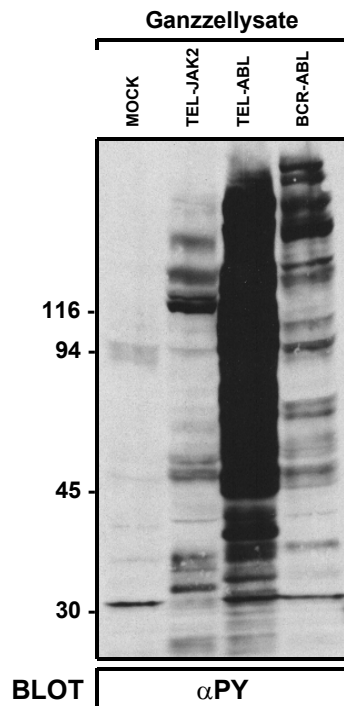
**Abbildung 8:**

Expression der leukämischen Fusionsproteine mit PTK-Aktivität in Ba/F3-Zellen:

Immunopräzipitation (IP) von myc-TEL-JAK2, myc-TEL-ABL mit dem 9E10-AK und von BCR-ABL mit dem monoklonalen c-abl-AK. Pro Lysat wurde 500µg Protein für die IP verwendet und auf ein 7,5-12,5% Gradientengel aufgetragen. Die Blots wurden mit anti-myc/abl inkubiert (oberer Teil), gestrippt und mit dem anti-phosphotyrosin-AK (PY99) gefärbt (unterer Teil).

Die stabil transfizierten Fusionsproteine induzierten dabei eine vielfältige Aktivierung bzw. Phosphorylierung von nachgeschalteten Zielproteinen, was mit dem Phosphotyrosin-AK in Ganzzelllysaten der Ba/F3-Poolzellen gezeigt werden konnte (Abbildung 8).

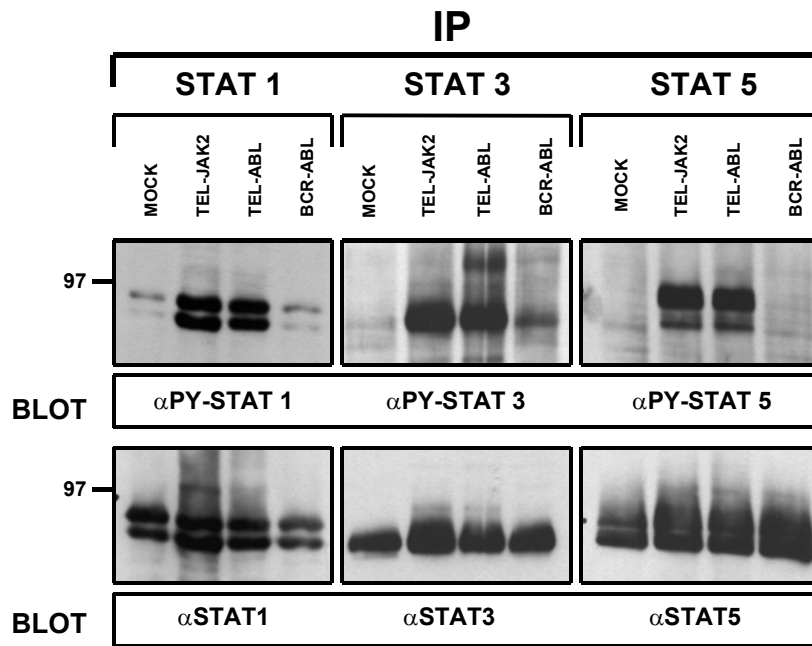
Hierbei präsentierte sich eine annähernd gleich starke Tyrosin-Phosphorylierung bei den Fusionsproteinen TEL-JAK2 und BCR-ABL, bei TEL-ABL hingegen eine weitaus stärkere. Die MOCK-Transfektion, also der reine Leervektor, zeigt so gut wie keine Phosphorylierung von nachgeschalteten Zielproteinen.



**Abbildung 9:**

50µg Ganzzelllysate der stabil transfizierten Ba/F3-Poolzellen wurde auf ein 7,5-12,5% Gradientengel aufgetragen. Die NC-Membran wurde mit dem anti-phospho-AK (PY99) inkubiert. Die Fusionsproteine, v.a. TEL-ABL, zeigen eine stärkere Phosphorylierung von „downstream targets“ als im Vergleich hierzu die MOCK-Kontrolle.

Um nun das Potential leukämischer Phosphotyrosinkinase auf die Aktivierung von STAT 1, 3 und 5 zu verdeutlichen, wurden die unter 3.2. generierten IL-3-faktorunabhängigen Ba/F3-Poolzellen zu weiteren Versuchen benutzt. Hierzu wurde mithilfe mehrerer IP's aus den einzelnen Transfektionen, unter Verwendung spezifischer anti-STAT-AK, die Aktivität der STAT-Proteine, beeinflusst durch TEL-JAK2, TEL-ABL und BCR-ABL, untersucht und durch Immunoblotting dargestellt. Aus dem oberen Teil der Abbildung 10 geht die relative Aktivierung durch Phosphorylierung der STAT's hervor, die mit einem polyklonalen anti-phosphotyrosin-STAT-AK demonstriert werden konnte. Aus dem unteren Teil der Abbildung 10 geht hervor, dass der Unterschied in der STAT-Aktivierung allein aus dem Einfluss der Fusionsproteine hervorgeht und nicht durch unterschiedliche Mengen von STAT-Proteinen. Hierzu wurde die Membran nach dem Strippen nochmals mit Antikörpern gegen STAT1, 3 und 5 inkubiert.

**Abbildung 10:**

STAT-Aktivierungsmuster in Ba/F3-Zellen nach stabiler Transfektion mit den angegebenen PTK-Fusionsproteinen. 1mg des jeweiligen Lysats wurde mit Anti-STAT1-,3-,5-AK immunopräzipitiert, in einem 7,5-12,5% Gradientengel separiert, geblottet, mit spezifischen polyklonalen anti-phospho-STAT-Antikörpern inkubiert, gestrippt und mit anti-STAT1/3/5-Antikörpern gefärbt.

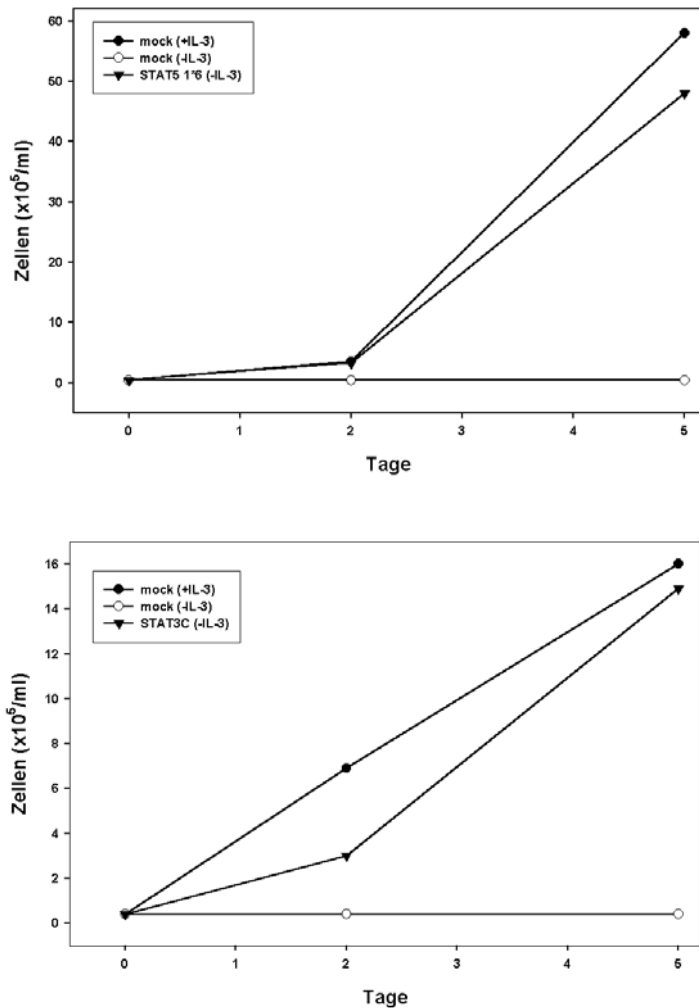
Wie in Abbildung 10 demonstriert, wurden STAT 1, 3 und 5 durchweg von TEL-JAK2 und TEL-ABL in etwa gleich stark phosphoryliert. BCR-ABL hingegen aktivierte nur schwach STAT 3. Die MOCK-transfizierten Zellen untermauern das Ergebnis durch:

- ⇒ fehlende Phosphorylierung von STAT 1, 3 und 5
- ⇒ vergleichbare Mengen von STAT-Proteinen (unterer Teil der Abbildung).

### 3.4. Konstitutiv aktives STAT 3 und STAT 5 induziert IL-3-unabhängiges Wachstum von Ba/F3-Zellen

STAT 3 und STAT 5 sind in einer Vielzahl von hämatologischen und soliden Tumoren ligandenunabhängig aktiviert, und es wurde angenommen, dass ihre konstitutive Aktivierung alleine ausreichend ist, epitheliale und hämatologische Zellen zu transformieren. Um dies zu analysieren, wurden eine konstitutiv-aktive STAT5- und STAT 3-Mutante mittels Elektroporation in native Ba/F3-Zellen transfiziert. Die STAT5A1\*6-Mutante wurde durch zweifache Mutagenese mithilfe einer PCR generiert, die in der DNA-Bindungsdomäne ( $H \rightarrow R^{298}$ ) und in der Transaktivierungsdomäne ( $S \rightarrow F^{710}$ ) lokalisiert ist (ONISHI et al 1998). Die STAT3C-Mutante wurde durch eine Cystein-Substitution an den Stellen A661 und N663 mittels in-vitro-Mutagenese generiert (BROMBERG et al 1999). Nach der stabilen Transfektion in Ba/F3-Zellen

induzierten beide STAT-Mutationen faktorunabhängiges Langzeitwachstum, ähnlich der MOCK-transfizierten Zellen in der Präsenz von IL-3 (Abbildung 10). Sowohl die stabile Transfektion der Konstrukte als auch die Proliferationsassays wurden in Zusammenarbeit mit Fr. Mack (biologische Doktorandin) aus unserer Arbeitsgruppe erstellt.



**Abbildung 11:**

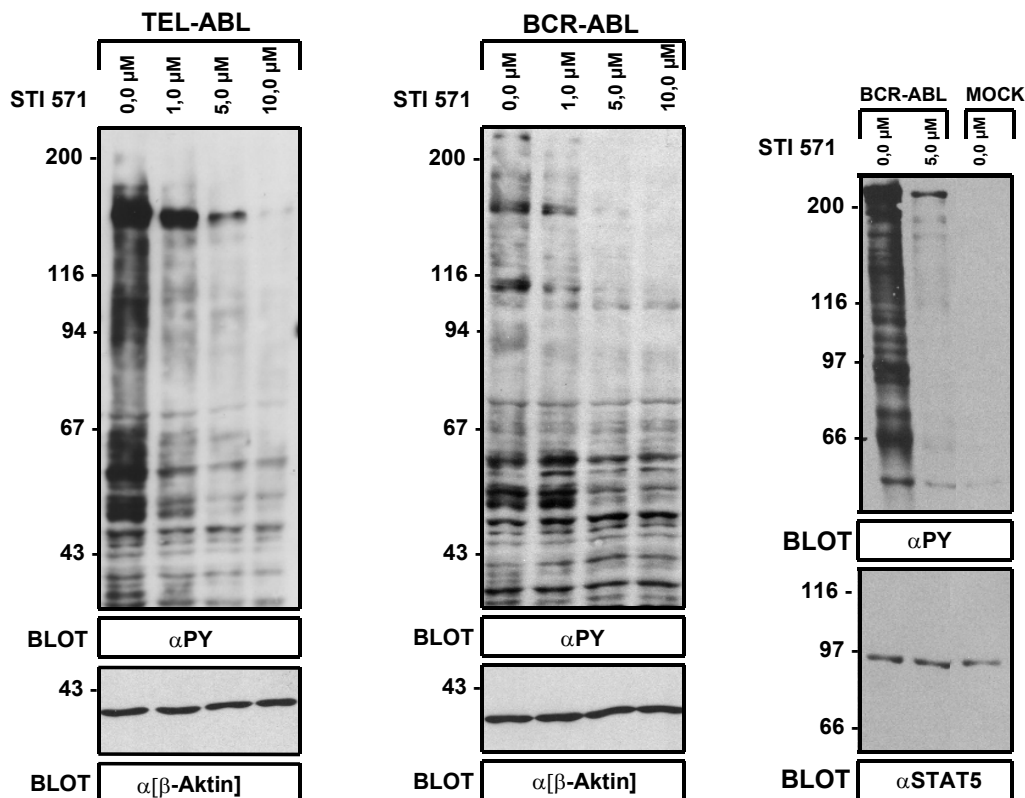
Transformation von Ba/F3 zu IL-3 unabhängig wachsenden Zellen durch konstitutiv-aktive STAT5- (oberer Teil der Abb.) und STAT3-Mutante (unterer Teil der Abb.). Nach der Transfektion mittels Elektroporation wurden die BA/F3-Zellen in Medium, das IL-3 und Blasticidin enthält, selektioniert. Faktorunabhängig wachsende Poolzellen wurden in einer Dichte von  $0,4 \times 10^5/\text{ml}$  ausgesät und mittels Trypanblau und der Neubauer-Kammer gezählt. Repräsentatives Ergebnis nach drei voneinander unabhängigen Zählungen.

### 3.5. Einfluss des Inhibitors STI571 auf die Phosphorylierung der Fusionsproteine und von STAT5 in Ba/F3-Zellen

Um Möglichkeiten zur Einflussnahme auf die STAT-Aktivierung zu verdeutlichen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Experimente mit den schon beschriebenen Inhibitoren STI571 und AG490 unternommen. Dabei kamen auch die unter 3.2. generierten IL-3-faktorunabhängigen Ba/F3-Zellen zur Verwendung. Leider ließen sich bei den mit

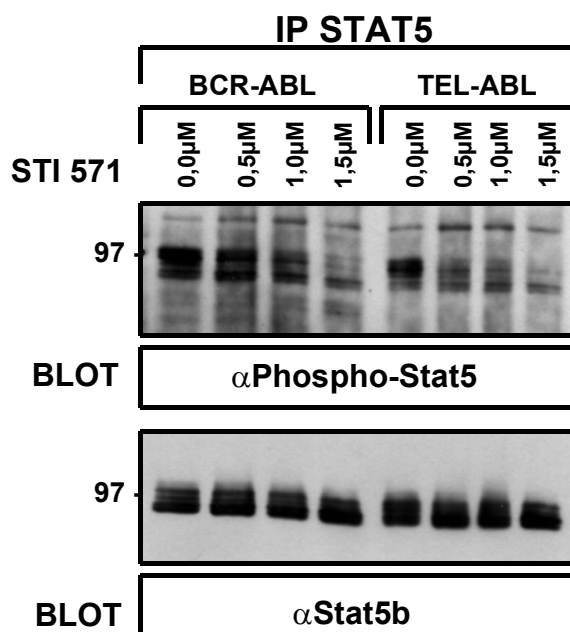
AG490 inkubierten, TEL-JAK2 transfizierten BA/F3-Zellen keine brauchbaren und demonstrierbaren Ergebnisse aufzeigen, weder in Bezug auf die Phosphorylierung der STAT-Moleküle noch auf die des Fusionsproteins selber. Mit STI571 jedoch konnte in Ganzzelllysaten der TEL-ABL- und BCR-ABL-transfizierten Poolzellen der Einfluss auf die Tyrosinphosphorylierung des Fusionsproteins und der nachgeschalteten Zielproteine dargestellt werden. Ebenso konnte im Immunoblot der Einfluss von STI571 auf das Aktivitätsmuster von STAT5, aber nicht von STAT3 und STAT1 gezeigt werden. In Abbildung 12 ist die Abnahme der Tyrosinphosphorylierung im TEL-ABL- und BCR-ABL-Poolzelllysate mit steigender Konzentration des Inhibitors dargestellt. Sowohl nachgeschaltete Zielproteine des Fusionsproteins als auch TEL-ABL (150kD) und BCR-ABL (210kD) selbst nehmen mit steigender Konzentration von STI571 in ihrem Phosphorylierungsgrad ab, bis bei der Konzentration von 10,0  $\mu\text{M}$  fast keine mehr erkennbar ist. Im Reblot ist wiederum die relativ gleiche Proteinmenge der einzelnen Banden abgebildet, so dass der Unterschied in der Färbung durch den Inhibitor bedingt ist (unterer Teil der Abb.12).

**Abbildung 12:**



TEL-ABL- und BCR-ABL stabil transfizierte Ba/F3-Poolzellen wurden 3,5h vor dem Lysieren in oben dargestellten Konzentrationen von STI571 inkubiert. Jeweils 50  $\mu\text{g}$  Lysat wurden zum Separieren der Proteine auf ein 7,5-12,5% Gradientengel aufgetragen, dieses geblottet und mit dem anti-phospho-AK (PY99) gefärbt. Anschließend wurde die NC-Membran gestrippt und mit einem anti-Aktin-AK oder dem anti-STAT5-Ak (Abbildung rechts) nachgefärbt.

Wie oben schon erwähnt, gelang es nur, den Einfluss auf STAT5 von TEL-ABL- und BCR-ABL transfizierten Ba/F3-Poolzellen, die mit STI571 behandelt wurden, aussagefähig darzustellen. Dabei konnte in Abbildung 13 gezeigt werden, dass schon bei relativ geringen Mengen von dem Inhibitor die mithilfe der IP durch den anti-STAT5-Antikörper dargestellten STAT5-Proteine in ihrem Phosphorylierungs- und Aktivitätsgrad abnehmen (siehe obere Hälfte der Abbildung). Dieser Einfluss wurde nicht durch die präzipitierten Proteinmengen hervorgerufen (siehe untere Hälfte der Abbildung), wie aus dem Reblot mit dem STAT5b-Antikörper hervorgeht.



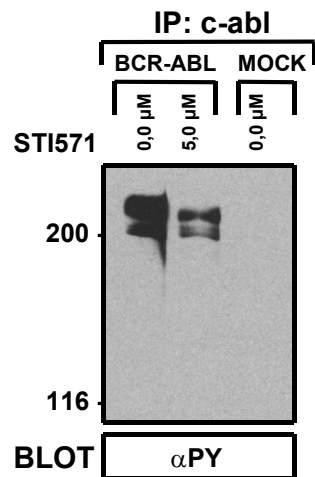
**Abbildung 13:**

TEL-ABL- und BCR-ABL transfizierte Ba/F3-Poolzellen wurden 3,5h vor dem Lysieren mit aufsteigenden Molaritäten von STI571 inkubiert. Jeweils 1mg des Lysats wurde mit dem anti-STAT5-AK immunopräzipitiert und in einem 7,5-12,5% Gradientengel wurden die Proteine separiert. Die geblottete NC-Membran wurde mit einem polyklonalen anti-phospho-STAT5-AK inkubiert, anschließend gestrippt und mit einem anti-STAT5b-AK nachgefärbt.

Hier sei noch zu bemerken und auf die anschließende Diskussion zu verweisen, dass beim Vergleich der Abbildungen 13 und 10 die unterschiedliche Phosphorylierung der STAT5-Moleküle bei den mit BCR-ABL-transfizierten Ba/F3-Zellen auffällt. Die mit 0,0µM STI571, also nur mit dem Lösungsmittel PBS behandelten Zellen weisen eine starke STAT5-Phosphorylierung auf, hingegen die unbehandelten aus der Abbildung 10 keine. Mögliche Gründe hierfür werden im folgenden Kapitel diskutiert.



Abbildung 14 demonstriert die Abnahme der konstitutiven Phosphorylierung des Fusionsproteins BCR-ABL in dem selben Zellsystem unter dem Einfluss von STI571.



**Abbildung 14:**

BCR-ABL transfizierte Ba/F3-Poolzellen wurden 3,5h vor dem Lysieren mit dem Inhibitor STI571 in angegebener Molarität behandelt. Mit 500 $\mu$ g des Lysats wurde eine IP mit dem anti-c-abl-AK durchgeführt, danach wurden die Proteine in einem 7,5-12,5% Gradientengel aufgetrennt und geblottet und die NC-Membran mit dem anti-phospho-AK (PY99) gefärbt.

## 4. Diskussion

STATs (Signal Transducer (=Vermittler) and Activator of Transcription) spielen eine entscheidende Rolle in der Weiterleitung von Signalen in hämatopoetischen Zellen durch eine große Vielzahl von Zytokinen. Kürzlich erschienene Daten von Patientenproben und von in-vivo und in-vitro Modellsystemen leukämischer Zellen konnten den Nachweis erbringen, dass STAT1, 3 und 5 einen maßgeblichen Einfluss in dem Prozess der malignen Transformation der akuten Leukämie haben (LIN et al. 2000 und GOUILLEUX-GRUART 1996). In unserer Arbeitsgruppe wurde die STAT1-, 3 und 5-Aktivierung von primären AML-Blasten untersucht, und in bis zu 95% der AML-Blasten eine konstitutive STAT-Aktivierung detektiert (SPIEKERMANN et al. 2002). Indem ein phosphotyrosin-spezifischer STAT-Antikörper verwendet wurde, konnte eine Aktivierung von STAT3 in 5 von 16 und STAT5 in 15 von 16 primären Blasten von AML-Patienten gezeigt werden (WEBER-NORDT et al. 1996 und XIA et al. 1998). Vergangene Veröffentlichungen jedoch demonstrieren, dass das Verhältnis der aktivierten STATs untereinander sehr unterschiedlich war, was die mögliche Schlussfolgerung zulässt, dass die in leukämischen Zellen aktivierten STATs nicht notwendigerweise die sind, die als Antwort auf Zytokinstimulation in nicht-transformierten Zellen dieser Zelllinie aktiviert werden. Als Beispiel induziert IL-3 und GM-CSF eine Aktivierung von STAT1 und 5 in myeloischen Zellen, jedoch scheint eine gesteigerte STAT3-Aktivierung die dominante Abnormalität in AML-Zellen zu sein (LIN et al. 2000). Als mögliche Ursachen für die differenzierenden Ergebnisse seien hier nur kurz die unterschiedlich verwendeten Populationen der AML-Subtypen, die unterschiedliche Quelle, d.h. periphere Leukozyten des Blutes versus Knochenmarkszellen, und die ungleichen Verfahren zur Präparation von Proben (frische versus gefrorene Zellen) erwähnt, die zu diesen ungleichen Ergebnissen führen könnten. Auch hat keine dieser Studien, inklusive dieser Arbeit, einen evidenten Zusammenhang zwischen klinischen Parametern oder der Aktivierung der MAP-Kinase (HAYAKAWA et al. 1998) und des STAT-Aktivierungsmusters detektieren können. Dessen ungeachtet ist die zentrale Rolle aktivierter STATs unbestritten in der Leukämogenese. Deshalb wurden in dieser Arbeit sowohl die Mechanismen als auch die biologische Relevanz der STAT-Aktivierung mithilfe von bekannten onkogenen Phosphotyrosinkinasen (PTK) untersucht. Ebenso wurde das transformierende

Potential von konstitutiv-aktiven STAT3- und STAT5-Mutanten auf eine Pro-B-Zelllinie aufgezeigt, als auch auf eine Möglichkeit der Einflussnahme in Form der zielgerichteten Molekül-Therapie („target-therapy“) auf aktivierte STAT-Proteine hingewiesen.

Kürzlich erschienene Arbeiten haben gezeigt, dass einige STATs sowohl überexprimiert als auch konstitutiv aktiv in leukämischen Zellen sind. Von entscheidender Bedeutung war zu wissen, ob die Überexpression zu maligner Entartung führt, oder ob die Überexpression eine Konsequenz aus der malignen Entartung ist. In unserer Arbeitsgruppe konnte kürzlich gezeigt werden, dass STAT1, 3 und 5, die eine wichtige Rolle in der Übermittlung von verschiedenen Signalen durch Zytokine wie IL-3, GM-CSF, EPO, TPO, EGF und IL-6 in myeloischen Zellen spielen, stark in primären AML-Blasten exprimiert werden (BIETHAHN et al. 1999). Darüberhinaus ist von der konstitutiven STAT-Aktivierung in AML-Zelllinien und in primären AML-Blasten unlängst in verschiedenen Arbeiten berichtet worden (SCHURINGA et al. 2000, WEBER-NORDT et al. 1996 und XIA et al. 1998).

Um die Mechanismen der STAT-Aktivierung in akuten Leukämien zu identifizieren, wurden verschiedene Gene, deren transformierendes Potential in der AML bekannt ist, auf ihre Fähigkeit hin untersucht, STATs zu aktivieren. Hierbei hatten in-vitro weder das leukämische Fusionsprotein PML-RAR $\alpha$  noch transformierende ras-Mutanten (SPIEKERMANN et al. 2002), jedoch verschiedene leukämische PTK eine starke Aktivierung von STAT1, 3 und STAT5 bei Überexprimierung in 293-Zellen zur Folge. Stabile Transfektion der leukämischen Fusionsgene TEL-JAK2, TEL-ABL und BCR-ABL resultierte in der Transformation von Ba/F3-Zellen und in konstitutiver STAT1-, 3- und STAT5-Aktivierung. Das transformierende Potential von aktivierten STAT3- und STAT5-Proteinen wurde in Ba/F3-Zellen demonstriert, die nach Transfektion mit konstitutiv-aktiven STAT-Mutanten faktorunabhängig proliferierten. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass vor allem STAT3 und STAT5 wichtige nachgeschaltete Zielproteine von leukämischen PTK sind, und dass ihre konstitutive Aktivierung alleine ausreicht, um hämatopoetische Vorläuferzellen zu transformieren. Deshalb sind die Signalwege, die durch eine konstitutive STAT-Aktivierung vermittelt werden, von besonderem Interesse, denn sie könnten vielversprechende Angriffsmöglichkeiten einer molekularen Therapie repräsentieren, auf die im Folgenden noch eingegangen werden soll.

In dieser Arbeit konnte nicht das Augenmerk auf das Thema der STAT-Aktivierung in normalen Zellen im Einzelnen gerichtet werden. Hier sei auf die reichhaltigen *Review-*

Arbeiten hingewiesen (IHLE 2001 und DARNELL 1997). Jüngst konnte in unserer Arbeitsgruppe jedoch gezeigt werden, dass CD-34<sup>+</sup>-Zellen große Mengen von STAT1-, 3- und STAT5 exprimieren (BIETHAHN et al. 1999). Chakraborty et al. führten eine detaillierte Analyse der STAT-Aktivierung in normalen CD-34<sup>+</sup>-Zellen und in AML-Blasten aus und fanden keinen Hinweis für eine konstitutive Aktivierung in normalen CD-34<sup>+</sup>-Zellen (CHAKRABORTY et al. 1996). Außerdem weisen normale periphere mononukleare Zellen des Blutes keine Expression von aktivierten Formen von STAT1, 3 und 5 auf (GOUILLEUX-GRUART et al. 1996 und WEBER-NORDT et al. 1996). Die Resultate dieser Arbeit unterstützen selbige Ergebnisse: In nativen, unstimulierten Ba/F3-Zellen oder 293-Zellen konnte keine Aktivierung von STAT1, 3 und 5 nachgewiesen werden.

PTK spielen eine bedeutende Rolle in der Proliferation und Differentiation von normalen und malignen hämatopoetischen Vorläuferzellen. Ihre konstitutive Aktivierung kann hämatopoetische Zellen in-vitro und in-vivo direkt transformieren. Die leukämischen Fusionsproteine BCR-ABLp210 und TEL-JAK2 haben gezeigt, dass sie ein letales myeloproliferatives Syndrom (MPS) oder akute Leukämien in Mäusen verursachen können. Unlängst haben genetische Untersuchungen klar dargestellt, dass STAT5 wesentlich für die Induktion eines myeloproliferativen Syndroms durch TEL-JAK2 ist, jedoch die Transformation von BCR-ABL nicht essentiell ist (SCHWALLER et al. 2000 und SEXL et al. 2000). In AML-Populationen von Patienten, die in unserer Arbeitsgruppe untersucht wurden, hat keine Probe in Übereinstimmung mit den zytogenetischen Routineanalysen eine Expression der Fusionsproteine TEL-ABL, BCR-ABL und TEL-JAK2 aufgewiesen. Darüber hinaus war keine DNA oder RNA in unseren 16 Patientenproben mithilfe von zytogenetischen Analysen für FLT3-Mutationen positiv (SPIEKERMANN et al. 2002). In einer erst kürzlich erschienenen Veröffentlichung haben Hayakawa et al. (1998) das STAT5-Aktivitätsmuster in 10 Patientenproben mit FLT3ITD-positiver AML ausgewertet. Alle Patienten wiesen eine konstitutive STAT5-Aktivierung auf. In Konkordanz hierzu steht das in Abbildung 3 dargestellte Ergebnis, das eine Aktivierung von STAT5A in einem überexprimierten Modellsystem der 293-Zellen durch FLT3ITD veranschaulicht. Betrachtet man jedoch insbesondere die relative Häufigkeit der STAT5-Aktivierung in der AML, nämlich 70-90%, müssen andere genetische oder funktionelle Abnormalitäten in AML-Zellen vorhanden sein, die in einer Aktivierung von Proteinkinasen resultieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen klar signifikante Unterschiede in dem Muster der STAT-Aktivierung auf, die von TEL-JAK2, TEL-ABL und BCR-ABL transformierten Ba/F3-Zellen induziert wurden. Im Gegensatz zu BCR-ABL, das STAT3 und STAT5 schwach aktivierte, verursachten TEL-JAK2 und TEL-ABL eine starke Tyrosinphosphorylierung von STAT3 und STAT5, obwohl eine vergleichbare Expressions der PTK (siehe Abb.7) vorhanden war. Diese Resultate stehen in guter Übereinstimmung mit den eben veröffentlichten in-vivo Studien der Arbeitsgruppen von G. Gilliland und J. Ihle, die ein Maus-Knochenmarks-Transplantations-Modell in STAT5a/b<sup>-/-</sup>-Knockout- und Wildtyp-Mäusen benutzten. Es konnte gezeigt werden, dass die Induktion eines myeloproliferativen Syndroms durch BCR-ABL unabhängig von STAT5 abläuft, wohingegen das myeloproliferative- und lymphoproliferative-Syndrom induziert durch TEL-JAK2 von STAT5 abhängt. Darüber hinaus können konstitutiv-aktive Mutanten von STAT5 IL-3-abhängige Ba/F3-Zellen zu faktorunabhängigem Wachstum transformieren (siehe Abb.10) und myeloproliferative Krankheiten in einem Knochenmarks-Transplantations-Modell verursachen (SCHWALLER et al. 2000). Diese Ergebnisse erbringen stichhaltig den Nachweis, dass eine konstitutive Aktivierung von STAT5 allein ausreichen kann, um hämatopoetische Zellen zu transformieren. Jedoch ist auch auf STAT-unabhängige Mechanismen der Transformation von Gelfanov et al. (2001) hingewiesen worden, die das Zusammenwirken der Signalwege durch AKT und MAPK bedingen.

Zusammengenommen existieren umfassende Hinweise, die die grundlegende Rolle von STAT3 und STAT5 in dem Prozess der malignen Transformation durch onkogene Phosphotyrosinkinasen untermauern. Allerdings zeigt der Beitrag des JAK/STAT-Signalweges zum leukämischen Phänotyp der Erkrankung eine signifikante Abweichung innerhalb der verschiedenen onkogenen Tyrosinkinasen.

Im Gegensatz zu den veröffentlichten Ergebnissen konnte das transformierende Potential von FLT3ITD in den hier benutzten Ba/F3-Zellen nicht demonstriert werden, obwohl mit dieser Mutation, wenn überexprimiert in 293-Zellen, eine eindeutige STAT3- und STAT5-Aktivierung dargestellt wurde (MIZUKI et al. 2000 und HAYAKAWA et al. 2000). Das pcDNA6A-FLT3wt und -ITD-Konstrukt, wie es in „Material und Methoden“ beschrieben ist, war von korrekter Nukleotidsequenz und wurde gut exprimiert (Ergebnisse sind hier nicht gezeigt), war hyperphosphoryliert in 293-Zellen (siehe Abb.1A) und induzierte eine Aktivierung von STAT3 und STAT5 im selben Zellsystem

(siehe Abb.3). Jedoch gelang es nicht, in mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen, stabile Ba/F3-Linien zu generieren, die die Konstrukte der Tyrosinkinasen FLT3wt und FLT3ITD exprimierten, weil die Zellen während der Selektion mit Blasticidin nicht hochwuchsen. Im Unterschied hierzu verursachten die im selben Vektor subklonierten zytoplasmatischen Phosphotyrosinkinasen TEL-JAK2, TEL-ABL und BCR-ABL reproduzierbar faktorunabhängiges Wachstum in Ba/F3-Zellen. Diese Ergebnisse stehen in Diskrepanz zu den neulich erschienenen Veröffentlichungen, die darstellen konnten, dass alle Patienten-spezifischen ITD-Mutanten (MIZUKI et al. 2000) und auch die erst kürzlich beschriebene FLT3D835-Mutante fähig waren, IL-3-unabhängiges Wachstum von Ba/F3-Zellen zu induzieren (YAMAMOTO et al. 2001). Eine mögliche Erklärung für diese gegensätzlichen Befunde könnte die hohe Expressionsrate des benutzten pcDNA6AFLT3-Konstrukts sein, das durch den starken CMV-Promoter angetrieben wird. Im Gegensatz zu dieser Möglichkeit haben andere Arbeitsgruppen ein retrovirales System via Infektion benutzt, das, von einem LTR-Promoter angetrieben, wesentlich niedrigere Expressionsraten erzielte. Außerdem, in Bezug auf den Erhalt von unreifen hämatopoetischen Vorläuferzellen, induziert der FLT3-Ligand (FL) Differenzierung von Myelomonozyten und hat eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von Pro-B-Zellen und dendritischen Zellen inne (ANTNYSAMY et al. 2000 und SHURIN et al. 1998). Obwohl das FLT3wt-Konstrukt, verglichen mit der ITD-Mutante, eine schwächere PTK-Aktivität hat, kann die Überexpression in eine autokatalytische Aktivierung resultieren. Aus diesem Grund könnte die hohe Expressionsrate des FLT3ITD-Konstrukts sowohl eine Differenzierung der Pro-B-Ba/F3-Zelllinie induziert, als auch eine direkte Toxizität bewirkt haben, die die Unmöglichkeit der Ba/F3-Zellen, die Selektion zu überleben, erklären könnte. Im Zuge anderer umfassender Untersuchungen ist es jedoch unserer Arbeitsgruppe später gelungen, bei der Verwendung eines retroviralen Vektors zur Umklonierung von FLT3wt zur ITD-Mutante, Ba/F3-Zellen zur IL-3-Unabhängigkeit zu transformieren (SPIEKERMANN et al. 2003).

Es konnte gezeigt werden, dass eine konstitutive Aktivierung von STAT3 oder 5 in bis zu 95% aller Patienten mit AML vorkommt (SPIEKERMANN et al. 2002). Bis jetzt sind Mutationen der Phosphotyrosinkinasen in ungefähr 30% der Neuerkrankungen der AML beschrieben worden, inklusive der internen Tandemduplikation von FLT3 (MIZUKI et al.

2000), der Mutationen der extrazellulären (GARI et al. 1999) und der katalytischen Domäne (BEGHINI et al. 2000) von Kit. Außerdem sind Kit und FLT3 in 60-90% der primären AML-Blasten auf der Zelloberfläche vertreten (BIRG et al. 1992 und SPERLING et al. 1997), und ihre Liganden FL und SCF werden von Stromazellen des Knochenmarks exprimiert. Deshalb kann die Stimulation von FLT3 oder Kit, entweder durch konstitutiv-aktive Mutationen der Klasse III-Rezeptortyrosinkinasen oder durch parakrine Stimulationsmechanismen, eine konstitutive STAT5-Aktivierung induzieren und könnte auch eine STAT5-Aktivierung, die in den meisten primären AML-Blasten gefunden wird, bedingen und erklären.

Kontrastierend hierzu wurde weder von Kit noch von FLT3 eine STAT3-Aktivierung durch Stimulation mit deren Liganden beschrieben. Die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch demonstrieren eine STAT3- und STAT5-Aktivierung in einem überexprimierten System der 293-Zellen, nur konnte die in dieser Arbeit verwendete FLT3-Mutante kein unabhängiges IL-3-Langzeitwachstum induzieren (siehe oben). Andere Mechanismen der STAT3-Aktivierung in AML-Blasten sind unlängst von Schuringa et al. beschrieben worden, die nachweisen konnten, dass AML-Zellen mit konstitutiver STAT3-Aktivität große Mengen des Zytokins IL-6 sezernieren. Darüber hinaus konnte mit anti-IL-6-Antikörper die IL-6-verursachte STAT3-Phosphorylierung wieder rückgängig gemacht werden, was durch einen möglichen autokrinen Mechanismus der STAT-Aktivierung erklärt wird (SCHURINGA et al. 2000). Weitere Einsichten in die Rolle der STAT3-Aktivierung bei der Überwachung früher Stammzellproliferation wurden von Audet et al. erbracht, die wiederum helfen werden, die Funktion von STAT3 in der malignen Hämatopoese aufzuklären (AUDET et al. 2001). Indem Knochenmarkszellen der Maus verwendet wurden, konnte der Autor zeigen, dass Signale via gp130 in Zusammenhang mit SCF und FL äußerst entscheidend sind für die Aufrechterhaltung hämatopoetischer Stammzellfunktion. Des Weiteren beeinträchtigt die Inhibierung durch eine dominant negative STAT3-Mutation selektiv das Langzeitwachstum hämatopoetischer Stammzellen (IL-HOAN et al. 2000).

Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass konstitutive Aktivität von STAT5 alleine ausreichend ist, um Ba/F3-Zellen zur Faktorunabhängigkeit zu transformieren. Hierzu wurde eine STAT5-Mutation verwendet, die durch zwei Punktmutationen, eine in der DNA-Bindungsdomäne und die andere in der Transaktivierungsdomäne, verändert

wurde. Diese Resultate sind in Übereinstimmung mit den bisherigem Report von Onishi et al. (1998) und betonen die Bedeutung des onkogenen Potentials von STAT5. Erst kürzlich konnte Schwaller et al. zeigen, dass diese STAT5-Mutation ein myeloproliferatives Syndrom in Mäusen verursacht hat, und identifizierte Onkostatine M (OSM) als ein wichtiges Zielmolekül, das die meisten transformierenden Effekte vermittelt (SCHWALLER et al. 2000). Im Gegensatz zu STAT5 konnte das transformierende Vermögen von STAT3 nur in epithelialen Zellen nachgewiesen werden, aber die Versuchsergebnisse aus dieser Arbeit über das transformierende Potential von STAT3 und die wesentliche Funktion von STAT3, der Regulation der Fähigkeit zur Selbsterneuerung von hämatopoetischen Stammzellen (siehe oben), unterstützen die entscheidende Rolle von STAT3 in der Leukämogenese.

Die Rolle vom aktivierten STAT1 jedoch scheint auch vor dem Hintergrund dieser Arbeit noch relativ unklar. Wie aus Abb. 4 und 10 zwar ersichtlich ist, aktivieren alle hier verwendeten onkogenen Fusionsproteine in beiden Zellsystemen konstitutiv STAT1, aber die Funktion der STAT1-Aktivierung ist noch weitgehend ungeklärt. Auch in zahlreichen anderen Veröffentlichungen ist die Aktivierung von STAT1 in einer Vielzahl von Tumorentitäten beschrieben worden (TURKSON, JOVE 2000 und BOWMAN et al. 2000). Dessen ungeachtet ist die Funktion des Moleküls eher mit Wachstumsstopp als mit maligner Transformation zu assoziieren und ist deshalb vielmehr als potentieller Tumorsuppressor zu erachten (BROMBERG et al. 1996). Erkenntnisse hierzu gewann man aus der Generierung von STAT1-Knockout-Mäusen, die lebensfähig waren, keine Entwicklungsdefizite und einen normalen Phänotyp zeigten. Nur, alle Funktionen, die mit dem physiologischen Aspekt des IFN-Signalweges, der Hauptaktivator von STAT1, assoziiert sind, fehlten gänzlich (MERAZ et al. 1996 und DURBIN et al. 1996). Diese Mäuse zeigten eine angeborene schwache Immunität bezüglich viraler Erkrankungen und entwickelten spontan Tumore (KAPLAN et al. 1998 und LEVY et al. 2000). Entsprechend konnte man bei der gezielten Ausschaltung der konstitutiven STAT1-Aktivierung in Plattenepithelkarzinomzellen (SCCHN) durch die Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden oder dominant-negativen STAT1-Konstrukten keinen Effekt auf das Zellwachstum verzeichnen (GRANDIS et al. 1998).

Kontrovers wird der IFN-induzierte Einfluss durch das STAT1-Signal auf die Expression von c-Myc diskutiert: Einerseits wurde gezeigt, dass STAT1 die c-Myc-Expression down-reguliert, und dass es andererseits einen STAT1-unabhängigen Signalweg gibt,



der die c-Myc-Expression hochreguliert, welcher wiederum von einem STAT1-abhängigen Signalweg inhibiert wird (RAMANA et al. 2000). Die STAT1-abhängige Inhibierung von c-Myc kommt auch unter dem Einfluss anderer Wachstumsfaktoren, wie z.B. PDGF, vor. Obwohl die physiologischen Konsequenzen aus dem Phänotyp der STAT1-Knockout-Mäuse nicht hervorgehen, würden die Ergebnisse voraussagen, dass ein STAT1-Mangel, vor dem Hintergrund der transgenen Expression durch IFN, einen dramatischen Phänotyp hervorbringen müsste (IHLE 2001).

Zusammenfassend besteht wachsender Hinweis darauf, dass eine STAT1-Aktivierung häufig zu antiproliferativen und pro-apoptotischen Signalen führt. Die Resultate dieser Arbeit, nämlich die Aktivierung von STAT1 durch leukämische Fusionsproteine (außer durch FLT3ITD), könnten teilweise damit erklärt werden, dass durch die onkogene Transformation der PTK in einer sich regulierenden Schleife die antiproliferativen Funktionen von STAT1 die proliferativen Wirkungen von STAT3 und 5 inhibieren sollen. Interessant wäre hierzu einexperimenteller Ansatz, der einen relativen Mangel von STAT1 zu STAT3 und 5 im Hinblick auf die transformierende Wirkung von konstitutiv-aktivem STAT3 und 5 aufzeigt, z.B. durch die Rückführung von IL-3-unabhängigen, mit STAT3C und STAT5C transformierten BA/F3-Zellen zur IL-3-Abhängigkeit.

Aufgrund ihrer entscheidenden Rolle in der Onkogenese haben zahlreiche Veröffentlichungen demonstriert, dass die Aktivierung des STAT3- und STAT5-Signalweges verschiedene Zielgene reguliert, die bei der Erhaltung der Homöostase der Zellfunktionen und beim Wachstum der Zellen beteiligt sind (BROMBERG 2000 und BOWMAN et al. 2000). Einige Studien haben gezeigt, dass das anti-apoptotische Gen, das für das Protein Bcl-x<sub>L</sub> kodiert, ein Zielgen von STAT3 und STAT5 darstellt (SOCOLOVSKY et al. 1998, GRANDIS et al. 2000, GESBERT et al. 2000). Durch die Blockierung von STAT3, indem man eine dominant negative Form, das STAT3β, benutzt, konnte man die durch IL-6 induzierte Expression von Bcl-x<sub>L</sub> in Myelomzellen reprimieren, so dass eine Sensibilisierung dieser Zellen in die durch Fas-vermittelte Apoptose resultierte (CATLETT-FALCONE et al. 1999). In gleicher Art und Weise hat die Unterbrechung des STAT3-Signals in Plattenepithel-Karzinomzellen des Kopfes und des Nackens (SCCHN) die Bcl-x<sub>L</sub>-Expression inhibiert, in Begleitung mit Induktion der Apoptose (GRANDIS et al. 2000). Ferner führt die Hemmung der Src-Kinase-Aktivität zu einer verringerten Phosphorylierung von STAT3 und in Folge sowohl zu einer Abnahme

der Bcl-x<sub>L</sub>-Expression als auch zur Einleitung des programmierten Zelltodes (KARNI et al. 1999). Aktiviertes STAT5 kann in BCR-ABL positiven myeloischen Zellen zur Apoptoseresistenz durch die Hochregulation von Bcl-x<sub>L</sub> führen (HUANG et al. 2002 und SOCOLOVSKY et al. 1999). Von einem anderen anti-apoptotischen Protein, dem Mcl-1, wurde gezeigt, dass es von STAT3 in leukämischen, großen granulierten Lymphozyten (LGL) und von STAT5 in CML-Zellen hochreguliert wird. Das Mcl-1 repräsentiert einen Überlebensfaktor für hämatopoetische Zellen (ZHOU et al. 1997) und trägt zur STAT-abhängigen Stimulierung mit GM-CSF eine Verzögerung der Apoptose in humanen neutrophilen Granulozyten bei. Vom Gen c-Myc, das bei der Kontrolle des Zellzyklus eine wichtige Rolle spielt, wurde gezeigt, dass es als Signalantwort auf STAT3 oder auch auf STAT5 in v-Src-transformierten NIH3T3-Fibroblasten aktiviert wird (LORD et al. 2000 und BOWMAN et al. 2001). STAT3-vermittelte c-Myc-Expression wird für die v-Src-induzierte Onkogenese und PDGF-induzierte Mitogenese benötigt (BOWMAN et al. 2001). Außerdem korrelieren Wachstumshemmung und Einleitung der Apoptose gut mit der Down-Regulation von c-Myc (HUANG et al. 2002). Ein anderes Beispiel, wie STAT3 und STAT5 in den Zellzyklus eingreifen, ist durch die wichtigen Cyclin-Kontrollgene. Konstitutive Aktivierung des STAT3-Signalweges ist assoziiert mit einer Induktion von Cyclin-D1 in Mausfibroblasten, wobei Cyclin-D1/D2 Zielgene von STAT5 sind (SINIBALDI et al. 2000 und MARTINO et al. 2001). Zusammenfassend lässt sich behaupten, dass die konstitutive Aktivierung von STAT3 und 5 in Zusammenhang mit einer permanenten Veränderung der Genexpression steht, die wiederum fundamentale zelluläre Prozesse kontrollieren und in die Onkogenese involviert sind.

Obwohl in vielen Arbeiten, sowie auch in dieser, gezeigt wurde, dass die STAT-Aktivierung alleine -mit bestimmten zellulären Hintergründen- ausreichend ist, um Zellen zu transformieren (BROMBERG et al. 1998), so ist es doch wahrscheinlicher, dass die STAT-Aktivierung im Zusammenspiel mit verschiedenen anderen Abnormalitäten in leukämischen Zellen auftritt (LIN et al. 2000). In jedwedem Fall stellt das Zielmolekül STAT eine attraktive Strategie dar, um Wachstumsstopp und Apoptose in leukämischen Zellen herbeizuführen, wie schon wiederholt für konstitutiv aktives STAT3 und 5 gezeigt wurde (BOWMAN 2000; TURKSON 2000 und SONG & GRANDIS 2002). Darüberhinaus haben die relativ milden Phänotypen der Versuche mit STAT-Knockout-Mäusen gezeigt, dass die STAT-Inhibierung ohne ausgedehnte Toxizität der Zellen einhergeht, ausgenommen STAT3<sup>-/-</sup>, das embryonal letal ist (SHIZUO et al. 1999). Eine

mögliche Erklärung für die gesteigerte Sensibilität von transformierten Zellen gegenüber Apoptose verglichen mit normalen Zellen ist, dass Tumorzellen irreversibel abhängig vom STAT-Signalweg geworden sind, um ihr Überleben zu sichern. Diese beobachtete Abhängigkeit von bestimmten Tumoren, aber nicht von normalen Zellen, von konstitutiver STAT-Aktivierung, hat entscheidenden Einfluss auf die Tumorthherapie, indem sie das Potential für bevorzugte Angriffspunkte offeriert.

Zielend auf dem STAT-Signalweg vorgeschalteter Tyrosinkinase-Aktivität hat die Entwicklung von selektiven Tyrosinkinase-Inhibitoren besondere Aufmerksamkeit auf sich gelenkt (GIBBS et al. 2000 und LEVITZKI 1999). Inhibitoren der JAK-Familie zum Beispiel, wie auch aus der Abb. 7 hervorgeht, die den Einfluss des Tyrphostins AG490 auf TEL-JAK2-transformierte BA/F3-Zellen zeigt, blockieren die STAT3-Aktivierung und das Überleben von humanen Myeloma-Zellen, von Brustkrebszellen und von Prostatakarzinom-Zellen (GARCIA et al. 2001 und MORA et al. 2002). Ebenso konnte in Abbildung 11, 12 und 13 unter der Wirkung des ABL-Inhibitors STI571 die Abnahme der Tyrosinkinase-Aktivität der Fusionsproteine BCR-ABL und TEL-ABL in BA/F3-Zellen und die Tyrosinphosphorylierung nachgeschalteter Zielproteine in Abhängigkeit der Konzentration des Agens demonstriert werden. In Übereinstimmung mit Versuchen anderer Arbeitsgruppen konnte auch die Abnahme der konstitutiven STAT5-Aktivierung konzentrationsabhängig von STI571, jedoch nicht, wie beschrieben, die der konstitutiven STAT3-Aktivierung dargestellt werden (Abb.13) (CARROLL et al. 1997 und HUANG et al. 2002). Obwohl diese Inhibitoren ausreichende biochemische Spezifität für ihr Zielmolekül zu haben scheinen, ist ein nicht unerheblicher Nachteil dieser Effektoren, dass sie multiple nachgeschaltete Signalwege, über den der STAT-Proteine hinaus, zu blockieren scheinen und deshalb die Wahrscheinlichkeit unerwünschter Toxizität erhöhen.

Zur Entwicklung therapeutischer Tumorinterventionen bleibt gegenwärtig ein wichtiges und vielversprechendes Forschungsziel das Beeinflussen oder Einwirken auf STAT-Proteine. Zusätzlich zu der Entwicklung von Tyrosinkinase-Inhibitoren, von Antisense-Oligonukleotiden (BOWMAN et al. 2000 und SONG et al. 2000) und von dominant-negativer STAT-Proteine (NIU et al. 1999 und 2001) wird es bedeutsam sein, alternative Strategien zur zielgerichteten STAT-Therapie zu erwägen (TURKSON et al. 2000 und SEIDEL et al. 2000). Solche Strategien könnten eventuell beinhalten: a) die Entwicklung von Antagonisten der Rezeptor-Liganden-Interaktion (z.B.

Zytokinantagonisten oder rezeptor-neutralisierende-Antikörper); b) die Beeinflussung STAT-interagierender Proteine (z.B. mit der PIAS- oder SOCS-Familie); c) die Inhibierung von STAT-aktivierender Serin-Kinasen; d) die Aktivierung von STAT-spezifischer Phosphatasen; e) die Beeinflussung STAT-regulierte Zielgene, die in den malignen Prozess involviert sind; und f) die Entwicklung von kleinen Molekülinhibitoren, die mit der STAT-Dimerisierung und der DNA-Bindung interferieren. In Bezug auf letztere Strategie wurde jüngst Fortschritt gemacht, indem man kurze Peptide gebildet hat, die sehr effektiv die STAT3-Dimerisierung und DNA-Bindung sowohl in-vitro als auch in-vivo blockiert hat (TURKSON et al. 2001).

Abschließend, aus der aufgezeigten und sich konzentrierenden Rolle vor allem von STAT3 und STAT5, sowohl leukämischer als auch untransformierter Zellen, lässt sich die Wichtigkeit der weiterführenden Forschung von den Wirkungen der STAT-Aktivierung und deren Protein-Protein-Interaktionen deutlich ableiten. Sowohl in der Reaktion auf Reize von Extern (durch Zytokine oder Wachstumsfaktoren) als auch von Intern (durch andere zytoplasmatische Nicht-Rezeptor-Kinasen) wird diese Rolle bestätigt. Ebenso die Wirkungen auf das weitere Verhalten der Zelle, z.B. im Sinne von Wachstum, Apoptose, Onkogenese und Genexpression, macht dies deutlich. Deshalb ist die Beeinflussung der STATs im Hinblick auf zielgerichteter Molekül-Tumorthérapie, z.B. durch Drug-Design, von wachsender Wichtigkeit.

## 5. Zusammenfassung

Zahlreiche Veröffentlichungen der letzten Jahre haben die konstitutive Aktivierung des STAT-Signalweges in einer großen Vielzahl von verschiedenen Tumorentitäten demonstriert. In Erkrankungen der Hämatopoese, insbesondere in akuten und chronischen Leukämien, konnte gezeigt werden, dass eine konstitutive Aktivierung von STAT1, 3 und 5, aber im Besonderen von STAT3 und STAT5, entscheidend an der Pathogenese der Erkrankung beteiligt ist. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob leukämische Fusionsproteine mit konstitutiver Proteintyrosinkinase (PTK)-Aktivität STAT1, 3 und 5 aktivieren und eine alleinige konstitutive Aktivierung von STAT3 und 5 ausreichend ist, um hämatopoetische Vorläuferzellen zu transformieren. Außerdem wurde untersucht, ob selektive PTK-Inhibitoren diese mitogenen Signalwege unterbrechen und eine Proliferationsinhibition in PTK-transformierten Zellen induzieren.

Es konnte gezeigt werden, dass die leukämischen Fusionsproteine TEL-JAK2, TEL-ABL, BCR-ABL und die Längenmutation FLT3ITD im Modell der 293-Zellen zu einer konstitutiven Aktivierung von STAT3 und 5 führten und nur das FLT3ITD-Konstrukt nicht zu einer STAT1-Aktivierung führte. Es konnte gezeigt werden, dass selbige Fusionsproteine, außer FLT3ITD, Ba/F3-Zellen, eine Pro-B-Zelllinie, zu faktorunabhängigem Wachstum transformierten und die Expression der Tyrosinkinasen annähernd gleich war. In den so generierten und stabil transfizierten Zelllinien konnten die Erkenntnisse auf die STAT1-, 3- und 5-Aktivierung aus den 293-Zellversuchen erhärtet und bestätigt werden. Um die bestimmende Rolle von aktiviertem STAT3 und 5 herauszuarbeiten, wurden konstitutiv-aktive STAT3- und STAT5-Mutanten in IL-3-abhängigen Ba/F3-Zellen stabil transfiziert, und es zeigte sich, dass konstitutiv-aktives STAT3 und 5 ausreichen, um in Ba/F3-Zellen faktorunabhängiges Wachstum zu induzieren. Außerdem konnte mit dem ABL-Inhibitor STI571 (Imatinib, Gleevec®) konzentrationsabhängig STAT5 inhibiert und eine Proliferationsinhibition in ABL-transformierten Zellen induziert werden.

Diese Ergebnisse unterstreichen die essentielle Rolle von STAT5 und auch von STAT3 in dem Prozess der malignen Transformation in der AML. Eine Hemmung dieses Signalweges durch kleinmolekulare selektive PTK-Inhibitoren stellt eine vielversprechende molekulare Therapiestrategie in akuten Leukämien dar.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Andreasson P, Johansson B, Carlsson M, Jarlsfelt I, Fioretos T, Mitelman F, Höglund (1997): BCR/ABL-negative chronic myeloid leukemia with ETV6/ABL fusion. *Genes, Chrom. & Canc.* 20, 299-304
2. Antonysamy MA, Thomson AW (2000): FLT3 ligand (FL) and its influence on immune reactivity. *Cytokine* 12, 87
3. Audet J, Miller CL, Rose-John S, Piret JM, Eaves CJ (2001): Distinct role of gp130 activation in promoting self-renewal divisions by mitogenically stimulated murine hematopoietic stem cells. *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 98, 1757
4. Becker S, Groner B, Muller C.W. (1998): Three-dimensional structure of the STAT3 $\beta$  homodimer bound to DNA. *Nature* 394, 145-151
5. Beghini A, Peterlongo P, Ripamonti CB, et al. (2000): C-KIT mutations in core binding factor leukemias. *Blood* 95, 726
6. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C (1976): Proposals for the classification of the acute leukemias. *Br J Haematol* 33, 451-458
7. Biethahn S, Alves F, Wilde S, Hiddemann W, Spiekermann K (1999): Expression of granulocyte colony-stimulating factor- and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-associated signal transduction proteins of the JAK/STAT pathway in normal granulopoiesis and in blast cells of acute myelogenous leukaemia. *Exp. Hematology* 27, 885
8. Birg F, Courcoul M, Rosnet O, et al. (1992): Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages. *Blood* 80, 2584
9. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R (2000): STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19, 2474-2488
10. Bowman T, Broome MA, Sinibaldi D, Wharton W, Jove R, et al. (2001): STAT3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 7319-7324

11. Brasel K, Escobar S, Anderberg R, de Vries P, Gruss HJ, Lyman SD (1995): Expression of the FLT3 receptor and its ligand on hematopoietic cells. *Leukemia*, 9, 1212-1218
12. Bromberg J (2001): Activation of STAT proteins and growth control. *Bioessays* 23, 161
13. Bromberg J, Darnell JE (2000): The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 19, 2468-2473
14. Bromberg J, Wrzeszczynska MH, Devgan G, et al. (1999): STAT3 as an oncogene. *Cell* 98, 295-303
15. Bromberg J, Horvath CM, Besser D, Lathem WW, Darnell JR (1998): STAT3 activation is required for cellular transformation by v-src. *Mol. Cell Biol.* 18, 2553
16. Bromberg J, Horvath CM, Wen Z, Schreiber RD, Darnell JE (1996): Transcriptionally active STAT1 is required for the antiproliferative effects of both interferon  $\alpha$  and interferon  $\gamma$ . *Proc. Nat. Acad. USA* 93, 7673-7678
17. Buettner R, Mora LB, Jove R (2002): Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Cl. Cancer Res.* 8, 945-954
18. Caldenhoven E, van Dijk TB, Solari R, Armstrong J, Raaijmakers JA, de Groot RP (1996): Stat3 $\beta$ , a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription. *J. Biol. Chem.* 271, 13221-13227
19. Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Jove R, et al. (1999): Constitutive activation of STAT3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 10, 105-115
20. Carroll M, Ohno-Jones S, Tamura S, Buchdunger E, Gilliland DG, Druker BJ, et al. (1997): CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL, and TEL-PDGFR fusion proteins. *Blood* 90, 4749-4952
21. Chakraborty A, White SM, Schaefer TS, Ball ED, Dyer KF, Tweardy DJ (1996): Granulocyte colony-stimulating factor activation of STAT3 $\alpha$  and STAT3 $\beta$  in immature normal and leukemic human myeloid cells. *Blood* 88, 2442
22. Chen X, Vinkemeier U, Zhao Y, Jeruzalmi D, Darnell J.E. (1998): Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell* 93, 827-839

- 
23. Cronkite EP (1987): Chemical leukemogenesis: benzene as a model. *Semin Hematol* 24, 2-11
  24. Curtis RE, Boice JDJ, Moloney WC, Ries LG, Flannery JT (1990): Leukemia following chemotherapy for breast cancer. *Cancer Res* 50, 2741-2746
  25. Darnell JE (1997): STAT's and gene-regulation. *Science* 277, 1630-1635
  26. deLapeyriere O, Naquet P, Planche J, et al. (1995): Expression of FLT3 tyrosine kinase receptor gene in mouse hematopoietic and nervous tissues. *Differentiation* 58, 351-359
  27. Durbin JE, Hackenmiller R, Simon MC, Levy DE (1996) : Targeted disruption of the mouse STAT1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* 84, 443-450
  28. Garcia R, Bowman TL, Niu G, Yu H, Minton S, Jove R, et al. (2001): Constitutive activation of STAT3 by the SRC and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene* 20, 2499-2513
  29. Gari M, Goodeve A, Wilson G, et al. (1999): C-KIT proto-oncogene exon 8 in-framedeletion plus insertion mutations in acute myeloid leukemia. *Br. J. Hematol.* 105, 894
  30. Gelfanov VM, Burgess GS, Litz-Jackson S, et al. (2001): Transformation of interleukin-3-independent cells without participation of STAT5/BCL-xL: cooperation of akt with raf/erk leads to p65 nuclear factor  $\kappa$ B-mediated antiapoptosis involving c-IAP2. *Blood* 98, 2508
  31. Gesbert F, Griffin JD (2000): BCR/ABL activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5. *Blood* 96, 2269-2276
  32. Gibbs JB (2000): Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research. *Science* 287, 1969-1973
  33. Gilliland GD, Griffin JD (2002): The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukaemia. *Blood* 100, 1532-1542
  34. Golub TR, Goga A, Barker GF, Afar DEH, Bohlander J, Gilliland DG, et al. (1996): Oligomerization of the ABL tyrosine kinase by the ETS-protein TEL in human leukaemia. *Mol. & Cell. Biol.* 16, 4107-4116
  35. Gouilleux-Gruart V, Gouilleux F, Desaint C et al. (1996) : STAT-related transcription factors are constitutively activated in peripheral blood cells from acute leukaemia patients. *Blood* 87, 1692



36. Grandis JR, Drenning SD, Chakraborty A, Zhou MY, Tweardy DJ, et al. (1998): Requirement of STAT3 but not STAT1 activation for epidermal growth factor receptor-mediated cell growth in vitro. *J. Clin. Investig.* 102, 1385-1392
37. Grandis JR, Drenning SD, Zeng Q, Watkins SC, Kim JD, et al. (2000): Constitutive activation of STAT3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 4227-4232
38. Hannemann JR, McManus DM, Kabarowski JH, Wiedemann LM (1998): Haematopoietic transformation by TEL/ABL oncogene. *Br. J. Haematol.* 102, 475
39. Hayakawa F, Towatari M, Iida H, et al. (1998): Differential constitutive activation between STAT-related proteins and MAP kinase in primary acute myelogenous leukaemia. *Br. J. Haematology* 101, 521
40. Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, et al. (2000): Tandem-duplicated FLT3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL3-dependent cell lines. *Oncogene* 19, 624
41. Huang M, Dorsey JF, Epling-Burnette PK, Landowski TH, Jove R, et al. (2002): Inhibition of BCR/ABL kinase activity by PD180970 blocks constitutive activation of STAT5 and growth of CML cells. *Oncogene* 21, 8804-8816
42. Hudak S, Hunte B, Culpepper J, et al. (1995): FTL3/FLK2 ligand promotes the growth of murine stem cells and the expansion of colony-forming cells and spleen colony-forming units. *Blood* 85, 2747-2755
43. Ihle JN (1997): Signaling by the cytokine receptor superfamily in normal and transformed hematopoietic cells. *Adv. Cancer Res.* 68, 23-65
44. Ihle JN (2001): The STAT family in cytokine signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 211
45. Il-Hoan O, Eaves CJ (2000): Retrovirus-mediated overexpression of a dominant negative form of STAT3 selectively impairs the long-term repopulating stem cell activity without affecting later stages of hematopoiesis. *Blood* #275 (abstract)
46. John S, Vinkemeier U, Soldaini E, Darnell J E, Leonard W J (1999): The significance of tetramerization in promoter recruitment by STAT 5. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1910-1918
47. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Schreiber RD, et al. (1998): Demonstration of an interferon  $\gamma$ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95, 7556-7561

- 
48. Karni R, Jove R, Levitzki A (1999): Inhibition of pp60c-Src reduces Bcl-XL expression and reverses the transformed phenotype of cells overexpressing EGF and HER-2 receptors. *Oncogene* 18, 4654-4662
  49. Kato H, Schull WJ (1982): Studies on mortality of A-bomb survivors. 7. Mortality, 1950-1978: Part I. Cancer mortality. *Radiat Res* 90, 395-432
  50. Kojima S, Matsuyama T, Sato T, Horibe K, Konishi S, Tsuchida M, Hayashi Y (1990): Down's Syndrome and acute leukemia in children: an analysis of phenotype by use of monoclonal antibodies and electron microscopic platelet peroxidase. *Blood* 76, 2348-2353
  51. Lacronique V, Boureux A, Della Valle V, Bernard OA, et al. (1997): A TEL/JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science* 278, 1309-1312
  52. Lathan B, Pfreundschuh M, Diehl V: Leukämien; in: *Innere Medizin*; hrsg. v. Classen M, Diehl V, Kochsiek K u.a.; Urban&Schwarzenberg 1994, 170-176
  53. Levitzki A (1999): Protein tyrosine kinase inhibitors as novel therapeutic agents. *Pharmacol. Ther.* 82, 231-239
  54. Levy DE, Gilliland DG (2000): Divergent roles of STAT1 and STAT5 in malignancy as revealed by gene disruptions in mice. *Oncogene* 19, 2505-2510
  55. Lin TS, Mahajan S, Frank DA (2000): STAT signaling in the pathogenesis and treatment of leukemias. *Oncogene* 19, 2496-2504
  56. Lord JD, McIntosh BC, Greenberg PD, Nelson BH (2000): The IL-2 receptor promotes lymphocyte proliferation and induction of the c-myc, bcl-2 and bcl-x genes through the transactivation domain of STAT5. *J. Immunol.* 164, 2533-2541
  57. Lisovsky M, Braun SE, Ge Y, et al. (1996) : FLT3-Ligand production by human bone marrow stromal cells. *Leukemia*, 10, 1012-1018
  58. Lyman SD (1995): Biology of FLT3 ligand and receptor. *Int. J. Hematol.* 62, 63-73
  59. Maroc N, Rottapel R, Rosnet O, et al. (1993): Biochemical characterization and analysis of the transforming potential of the FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 8, 909-918
  60. Martino A, Holmes JH, Lord JD, Moon JJ, Nelson BH (2001): STAT5 and Sp1 regulate transcription of the cyclin D2 gene in response of IL-2. *J. Immunol.* 166, 1723-1729

61. Matthews W, Jordan CT, Wiegand GW, Pardoll D, Lemischka IR (1991): A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. *Cell* 65, 1143
62. Meraz MA, White JM, Sheehan KC, Schreiber RD, et al. (1996): Targeted disruption of the STAT1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK/STAT signaling pathway. *Cell* 84, 431-442
63. Mizuki M, Fenski R, Halfter H, et al. (2000): FLT3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the RAS and STAT5 pathway. *Blood* 96, 3907
64. Mora LB, Buettner J, Seigne J, Diaz N, Garcia T, Bowman R, Jove R, et al. (2002): Constitutive activation of STAT3 in human prostate tumors and cell lines: inhibitors of STAT3 signaling block growth of prostate cancer cells. *Cancer Res.* 62, 6659-6666
65. Nakao M, Yokota S, Iwai T, et al. (1996) : Internal tandem duplication of the FLT3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 10, 1911-1918
66. Nielsen M, Kaltoft K, Nordahl M, Röpke C, Sejgard A et al. (1997): Constitutive activation of a slowly migrating isoform of STAT3 in mycosos fungoides: tyrphostin AG490 inhibits STAT3 activation and growth of mycosis fungoides tumor cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 6764-6769
67. Niu G, Heller R, Catlett-Falcone, Jove R, Yu H, et al. (1999): Gene therapy with dominant-negative STAT3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor in vivo. *Cancer Res.* 59, 5059-5063
68. Niu G, Shain KH, Huang M, Dalton WS, Jove R, Yu H, et al. (2001): Overexpression of a dominant-negative STAT3-variant in tumor cells leads to production of soluble factors that induce apoptosis and cell cycle arrest. *Cancer Res.* 61, 3276-3280
69. Okuda K, Golub TR, Gilliland DG, Griffin JD (1996): p210BCR/ABL, p190BCR/ABL, and TEL/ABL activate similar signal transduction pathways in hematopoietic cell lines. *Oncogene* 13, 1147-1152
70. Onishi M, Nosaka T, Misawa K, et al. (1998): Identification and characterization of a constitutively active STAT5 mutant that promotes cell survival. *Mol. Cell Biol.* 18, 3871

71. Papadopoulos P, Ridge SA, Boucher CA, Stocking C, Wiedemann LM (1995) : The novel activation of ABL by fusion to an ets-related gene, TEL. *Cancer Res.* 55, 34-38
72. Parganas E, Wang D, Stravadopis D, Topham DJ, van Deursen JM, et al. (1998): JAK2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* 93, 385-395
73. Peeters P, Raynaud SD, Cools J, et al. (1997): Fusion of TEL, the ETS-variant gene 6 (ETV6), to the receptor-associated kinase JAK2 as a result of t(9;12) in a lymphoid and t(9;15;12) in a myeloid leukaemia. *Blood* 90, 2535
74. Raaijmakers R, De Witte T, Joziase J, Van Der Lely N, Boezeman J, Haanen C (1991): In vitro growth pattern and differentiation predict for progression of myelodysplastic syndrome to acute nonlymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 78, 35-41
75. Ramana CV, Grammatikakis N, Chernov M, Stark GR, et al. (2000): Regulation of c-myc expression by IFN- $\gamma$  through STAT1-dependent and -independent pathways. *Embo J.* 19, 263-272
76. Rasko JE, Metcalf D, Rossner MT, Begley CG, Nicola NA (1995): The FLT3/FLK2 ligand: receptor distribution and action on murine haematopoietic cell survival and proliferation. *Leukemia* 9, 2058-2066
77. Rosnet O, Buhring HJ, Marchetto S, et al. (1996): Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignanthuman hematopoietic cells. *Leukemia* 10, 238-248
78. Sasse J, Hemmann U, Schwartz C, Horn F et al. (1997): Mutational analysis of acute-phase response factor/STAT3 activation and dimerization. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4677-4686
79. Schuringa JJ, Wieranga AT, Kruijer W, Vellenga E (2000): Constitutive STAT3, TYR705, and SER727 phosphorylation in acute myeloid leukemia cells caused by the autocrine secretion of interleukin-6. *Blood* 95, 3765
80. Schwaller J, Parganas E, Wang D, et al. (2000): STAT5 is essential for the myelo- and lymphoproliferative disease induced by TEL/JAK2. *Mol. Cell* 6, 693
81. Seidel HM, Lamb P, Rosen J (2000): Pharmaceutical intervention in the JAK/STAT signaling pathway. *Oncogene* 19, 2645-2654

- 
82. Sexl V, Piekorz R, Moriggl R, et al. (2000): STAT5A/B contribute to interleukin 7-induced B-cell precursor expansion, but ABL- and BCR/ABL-induced transformation are independent of STAT5. *Blood* 96, 2277
  83. Shizuo Akira (1999): Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. *Stem cells* 17, 138-146
  84. Shuai K, Horvath CM, Huang LH, Qureshi SA, Cowburn D, Darnell JE (1994): Interferon activation of the transcription factor STAT involves dimerisation through SH2-phosphotyrosyl peptide interaction. *Cell* 76, 821-828
  85. Shurin MR, Esche C, Lotze MT (1998): FLT3: receptor and ligand. Biology and potential clinical application. *Cytok. Growth Factor Rev.* 9, 37
  86. Sinibaldi D, Wharton W, Turkson J, Bowman T, Pledger WJ, Jove R (2000): Induction of p21WAF1/CIP1 and cyclin D1 expression by the Src oncoprotein in mouse fibroblasts: role of activated STAT3 signaling. *Oncogene* 19, 5419-5427
  87. Socolovsky M, Fllon AE, Wang S, Brugnara C, Lodish HF (1999): Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in STAT5a-/-5b-/-mice: a direct role for STAT5 in BCL-X(L) induction. *Cell* 98, 181-191
  88. Song JI, Grandis JR (2000): STAT signaling in head and neck cancer. *Oncogene* 19, 2489-2495
  89. Sperling C, Schwartz S, Buchner T, Thiel E, Ludwig WD (1997): Expression of the stem cell factor receptor C-KIT (CD117) in acute leukemias. *Hematologica* 82, 617
  90. Spiekermann K, Pau M, Schwab R, Hiddemann W, et al. (2002): Constitutive activation of STAT3 and STAT5 is induced by leukemic fusion proteins with protein tyrosine kinase activity and is sufficient for transformation of hematopoietic precursor cells. *Exp. Hemat.* 30, 262-272
  91. Spiekermann K, Dirschinger RJ, Schwab R, Bagrintseva K, Faber F, Hiddemann W., et al. (2003): The protein tyrosine kinase inhibitor SU5614 inhibits FLT3 and induces growth arrest and apoptosis in AML-derived cell lines expressing a constitutively activated FLT3. *Blood* 101, 1494-1504
  92. Turkson J and Jove R (2000): STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene* 19, 6613-6626

- 
93. Turkson J, Ryan D, Kim JS, Zhang Y, Hamilton AD, Jove R, et al. (2001): Phosphotyrosyl peptides block STAT3-mediated DNA-binding activity, gene regulation, and cell transformation. *J. Biol. Chem.* 276, 45443-45455
  94. Vinkemeier U, Cohen S L, Moaefi I, Chait B T, Kuriyan J, Darnell J E (1996): DNA binding of in vitro activated STAT1 $\alpha$ , STAT1 $\beta$  and truncated STAT1. *Embo J.* 15, 5616-5626
  95. Voss J, Posern G, Hannemann JR, Wiedemann LM, Feller SM, et al. (2000): The leukaemic oncoproteins BCR/ABL and TEL/ABL (ETV6/ABL) have altered substrate preferences and activate similar intracellular signaling pathways. *Oncogene* 19, 1684-1690
  96. Warmuth M, Danhauser-Riedl S, Hallek M (1999): Molecular pathogenesis of chronic myeloid leukaemia: implications for new therapeutic strategies. *Ann. Hematol.* 78, 49-64
  97. Weber-Nordt RM, Egen C, Wehinger J, et al. (1996): Constitutive activation of STAT proteins in primary lymphoid and myeloid leukaemia cells and in Epstein-Barr virus (EBV)-related lymphoma cell lines. *Blood* 88, 809
  98. Weiss A, Schlessinger J (1998): Switching signals on or off by receptor dimerization. *Cell* 94, 277-280
  99. Wen Z, Zhong Z, Darnell JE (1995): Maximal activation of transcription by STAT1 and STAT3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82, 241-250
  100. Xia Z, Baer MR, Block AW, Baumann H, Wetzler M (1998): Expression of signal transducers and activators of transcription proteins in acute myeloid leukaemia blasts. *Cancer Res.* 58, 3173
  101. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, et al (2001): Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 97, 2434
  102. Zhou P, Qian L, Kozopas KM, Craig RW (1997): Mcl-1, a Bcl-2 family member, delays the death of hematopoietic cells under a variety of apoptosis-inducing conditions. *Blood* 89, 630-643

## 7. Anhang

### 7.1. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
BSA	Bovines Serumalbumin
CML	chronische myeloische Leukämie
CLL	chronische lymphatische Leukämie
EGF	Epidermal Growth Factor
EPO	Erythropoetin Precursor
FCS	fötales Kälberserum
FL	FLT3-Ligand
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor
ITD	interne Tandemduplikation
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IP	Immunopräzipitation
JAK	Janus-Kinase bzw. Just Another Kinase
kDa, kD	Kilodalton
NC	Nitrocellulose
MAP(K)	Mitogen Activated Protein (Kinase)
PBS	Phosphat Buffered Saline
PML-RAR	Promyelocytic Leukemia-Retinoic Acid Receptor
MPS	Myeloproliferatives Syndrom
PTK	Phosphotyrosinkinase
SCF	Stem Cell Factor
SH2, SH3	Src-Homology 2 bzw. 3
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TPO	Thrombopoietin Precursor
wt	Wildtyp

## **7.2. Aus dieser Arbeit hervorgegangene Veröffentlichung**

Spiekermann K, Pau M, Schwab R, Schmieja K, Franzrahe S, Hiddemann W (2002):

Constitutive activation of STAT3 and STAT5 is induced by leukemic fusion proteins with protein tyrosine kinase activity and is sufficient for transformation of hematopoietic precursor cells.

*Experimental Hematology* 30 (2002), 262-271

## **7.3. Danksagung**

Für die Ermöglichung der Arbeit in der Klinischen Kooperationsgruppe zwischen der Medizinischen Klinik III und der gsf möchte ich Herrn CA Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Karsten Spiekermann für die Überlassung des Themas und für die unmittelbare und konstruktive Unterstützung bei der Umsetzung der Arbeit.

Ebenso bin ich den Mitarbeitern des Labors, v.a. Frau Ruth Schwab, zu eingehendem Dank verpflichtet, die mich nicht nur in technischen Belangen jederzeit mit Rat und Tat unterstützten, sondern mir auch immer moralisch beistanden.



## 7.4. Lebenslauf

### ■ Persönliche Daten

---

Michael Johann Pau  
geb. am 08.09.1968 in München

### ■ Schul- und Berufsausbildung

---

07/85	Mittlere Reife, Maria-Probst-Realschule in München
09/85 – 02/88	Berufsausbildung zum Industriekaufmann bei der Fa. Konen, Herrenkleider; Kaufmannsgehilfenbrief
09/88 – 06/90	zweiter Bildungsweg: Berufsoberschule für Wirtschaft, München; Fachgebundene Hochschulreife
12/90 – 08/91	Expedition/Reise: Afrikadurchquerung von Marokko bis Namibia mit meiner Lebensgefährtin im eigenen Geländewagen
09/91 – 06/92	« Institute Français/CCI de Munich » Abitur der 2. Fremdsprache: Allgemeine Hochschulreife

### ■ Hochschulausbildung

---

11/92 – 04/94	Studium der Physik an der LMU-München; Abbruch nach dem 3.Semester
05/95 – 10/02	Medizinstudium an der LMU-München -03/98 Physikum -03/99 1.Staatsexamen -08/01 2.Staatsexamen -10/02 3.Staatsexamen

### ■ klinische Tätigkeiten

---

10/01	1. Tertial-PJ: Orthopädie, Sportorthopädie, Klinikum Rosenheim
02/02	2. Tertial-PJ: Febr./März in Bologna (Chirurgia d'Urgenza) April/Mai Chirurgie Klinikum Innenstadt, LMU-München
06/02	3. Tertial-PJ: Innere Medizin, Städt. KH Harlaching-München, Intensivstat.
04/03	Arzt im Praktikum an der Kreisklinik Wolfratshausen, Chirurgie